

**LOKALISATION VON KOMPONENTEN DES RENIN-ANGIOTENSIN-
SYSTEMS IM HYPOTHALAMUS VON NORMOTENSIVEN (SPRAGUE-
DAWLEY) UND TRANSGEN-HYPERTENSIVEN (TGR(mREN2)27)
RATTEN**

[Unter besonderer Berücksichtigung des *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN)]

(EINE LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIE)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
MARTIN ALEXANDER THOMAS
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2004

vom Fachbereich Biologie und Informatik der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....

Gutachter:.....

Datum der Disputation:.....

ZUSAMMENFASSUNG

Angiotensin II (ANG II), das physiologisch aktivste Produkt des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), ist als ein Vasokonstriktor maßgeblich an der Modulation des Blutdrucks beteiligt. Darüber hinaus spielt das Octapeptid eine wichtige Rolle in der Freisetzung von Vasopressin und Hypophysenhormonen und reguliert den Flüssigkeits- und Salzhaushalt. Die Modulation des Blutdrucks sowie die Stimulation der Vasopressinfreisetzung werden über seine AT₁-Rezeptoren vermittelt. Viele dieser physiologischen Funktionen zeigen eine klare Tag/Nacht-Variation.

Der *Nucleus suprachiasmaticus* des Hypothalamus (SCN) repräsentiert den zentralen Schrittmacher der circadianen Uhr der Säugtiere und reguliert mitunter den Schlaf/Wach-Zyklus und den circadianen Rhythmus des Blutdrucks. Mit der Entwicklung eines transgen-hypertensiven Rattenstammes [TGR(mREN2)27], der über eine der Herzfrequenz und Aktivität entgegengesetzt phasenverschobene circadiane Rhythmik des Blutdrucks verfügt, konnte eine enge physiologische Beziehung zwischen ANG II und dem SCN aufgezeigt werden. Diese Hypertonie wird durch das zusätzliche und zudem noch übermäßig exprimierte Mäuse-Renin2-Gen im Zirkulations-RAS dieser Ratten verursacht. Die hieraus folgende übermäßige Bereitstellung von Renin im Blutkreislauf führt zu einer erhöhten Konzentration von ANG II im systemischen Kreislauf.

Die Funktionswege, die zur phasenverschobenen circadianen Rhythmik des Blutdrucks bei TGR führen sowie die Rolle, die das Octapeptid ANG II generell in der Blutdruckmodulation bei normotensiven und transgen-hypertensiven Tieren spielt, sind noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass das Gehirn-RAS über eine autonome ANG II-Synthese Einfluss auf die Modulation des Blutdrucks ausübt. Ob dieser Einfluss des Gehirn-RAS direkt am zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik ansetzt und ob und wie sich dieser Einfluss durch das Transgen der TGR verändert, ist ebenfalls nicht bekannt.

Um die Wirkung des im Blutkreislauf übermäßig vorhandenen ANG II auf Komponenten des Gehirn-RAS in Hirnarealen vor und hinter der funktionellen Blut/Hirn-Schranke auf zuzeigen, wurden im Verlauf dieser Arbeit der SCN sowie zwei Zirkumventrikularorgane von normotensiven Sprague-Dawley (SDR) und transgen-hypertensiven TGR(mREN2)27 (TGR) Ratten auf die Dichte und Verteilung ihrer AT₁-Rezeptoren hin überprüft.

Da die physiologische Rolle von ANG II im SCN selbst auch ungeklärt ist und ultrastrukturelle Befunde zur Lokalisation des Octapeptids und seiner AT₁-Rezeptoren im SCN bisher nicht verfügbar sind, wurde in dieser Dissertationsarbeit eine immunhistologische Technik entwickelt, mit deren Hilfe sich Immunreaktionen gegen das Octapeptid ANG II und seine AT₁-Rezeptoren auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene darstellen lassen.

Die hier beschriebenen Befunde machen den Einfluss des Transgens - vermittelt durch die erhöhte ANG II-Konzentration im Blutkreislauf von TGR - auf Veränderungen in Dichte und Verteilung der AT₁-Rezeptoren in Hirnarealen vor und hinter der funktionellen Blut/Hirn-Schranke deutlich. AT₁-Rezeptoren erscheinen in Hirnarealen mit offenem Kapillarsystem reduziert, im SCN dagegen unverändert und in anderen Regionen mit funktioneller Blut/Hirn-Schranke teilweise erhöht. Lokal begrenzte Veränderungen in der Bereitstellung der AT₁-Rezeptoren innerhalb einzelner Kerngebiete hängen maßgeblich von deren topographischer Organisation ab, die bei bisherigen autoradiographischen- und Ligand-Bindungs-Studien jedoch keine Berücksichtigung fand.

Die hier vorliegende Arbeit demonstriert erstmalig, dass ANG II im SCN als ein Neurotransmitter und -Modulator fungiert, dessen Effekte über seinen AT₁-Rezeptor vermittelt werden. Der Rezeptor vermittelt des Weiteren auch den aktiven - vermutlich bidirektionalen - Transport von ANG II durch die Kapillarendothelien des SCN und ist an der Aufnahme von ANG II (Endozytose) und dessen intrazellulären Transport in einem Hormon/Rezeptor-Komplex in Neuronen, Glia- und Endothelzellen im SCN beteiligt. Die Befunde machen darüber hinaus eine Synthese von ANG II in distinkten Neuronen des SCN wahrscheinlich und deuten an, dass autonom produziertes ANG II im SCN an der Regulation des Blutdrucks und der Freisetzung von Vasopressin beteiligt ist.

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
0. GLOSSAR	2
I. EINLEITUNG	3
I.1 Fragestellung	11
II. MATERIAL & METHODE	13
II.1 Versuchstiere	13
II.2 Verwendete Antikörper	13
II.3 Methodische Überlegungen zur Herstellung von Kunstharzpräparaten	15
II.4 Protokoll der Immunhistologie an Paraffinpräparaten	18
II.5 Protokoll der Immunhistologie an Kunstharzpräparaten	19
II.6 Dokumentation der Flacheinbettung und Semi- / Ultra-Dünnschnittprotokolle	19
II.7 Färbungen mit Methylenblau	20
II.8 Dokumentation licht- und elektronenmikroskopischer Ergebnisse	20
III. LICHTMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE	21
III.1 Die immunhistologisch bearbeiteten Hirnareale im Überblick	21
III.2 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie in der AV3V und der präoptischen Region von SDR und TGR	27
III.3 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie in den Hirnventrikeln von SDR und TGR	47
III.4 Vasopressin-Immunhistologie im PVN, SON und SCN an Paraffinpräparaten von SDR	61
III.5 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie im PVN, SON und SCN an Paraffinpräparaten von SDR	63
III.6 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie im SCN an Paraffinpräparaten von TGR	70
III.7 ANG I/II- und ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie im SCN an Kunstharzpräparaten von SDR	72
III.8 Dichte und Verteilung der AT₁-Rezeptoren in den untersuchten Gehirnarealen von SDR und TGR im Überblick	80
IV. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE	82
IV.1 ANG II (AT₁)-Rezeptor- und ANG I/II-IR in Kapillaren des dorsalen Hypothalamus	82
IV.2 ANG I/II und seine AT₁-Rezeptoren im Ependym des 3. Ventrikels	88
IV.3 Einfach- und Doppelkontrastierungen verdecken immunreaktive Details	91
IV.4 Elektronenmikroskopische Lokalisation von ANG I/II und seiner AT₁-Rezeptoren im SCN	92
V. DISKUSSION	108
V.1 Diskussion der Methode unter Berücksichtigung alternativer Techniken	108
V.2 Lokalisation von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im Hypothalamus und angrenzenden Arealen von normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene	115
V.3 Die Genese des Octapeptids ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im ‚Zentralen Nerven-system‘ von normotensiven Ratten	121
V.4 Die Verteilung der AT₁-Rezeptoren und der rezeptorgebundene Transport von ANG II und im ‚Zentralen Nervensystem‘ normotensiver und transgen-hypertensiver Ratten	125
V.5 Funktionelle Aspekte von ANG II in den Zirkumventrikularorganen, dem <i>Plexus choroideus</i> und dem <i>Nucleus suprachiasmaticus</i> bei normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten	136
VI. AUSBLICK UND OFFENE FRAGEN	159
VII. LITERATURVERZEICHNIS	162
VIII. ANHANG	170
IX. DANKSAGUNG, VERZEICHNIS DER EIGENEN PUBLIKATIONEN & LEBENSLAUF	178

0. GLOSSAR:

A:			
AB	Abluminal, dem Lumen abgewandte Seite	mVb	Multivesikuläre Körper
AC	<i>Commissura anterior</i>		N:
ANG I	Angiotensin I	N	Zellkern (<i>Nucleus</i>)
ANG II	Angiotensin II	nE	Kernhülle (nuclear envelope)
AT _{1-n}	Angiotensin Rezeptoren	N _E	Zellkern einer Endothelzelle
Ax	Axon	nmA	nichtmuskuläres Gefäß
		N _p	Zellkern eines Perizyten
C:			O:
c	Zilie		<i>Chiasma opticum</i>
CAP	Blutgefäßlumen	OC	Osmiumtetroxid
CC	<i>Corpus callosum</i>	OSO ₄	<i>Organum vasculosum lamina terminalis</i>
Cg	<i>Cingulum</i>	OvLT	
ChP	<i>Plexus choroideus</i>		P:
CP	<i>Caudatum putanem</i>		Phosphatpuffer
CVO	Zirkumventrikularorgan	PB	Salzhaltiger Phosphatpuffer
		PBS	Paraformaldehyd
D:		PFA	Pikrinsäure
D	Dendrit	PiS	Perizytenfortsatz
D _{1-n}	Dictyosome # 1-n	P _p	perivaskuläre Region
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	periR	postsynaptische Region
Di	Dictyosom	posA	präsynaptische Region
		prsA	pinozytischer Vesikel
E:		pV	<i>Nucleus paraventricularis</i>
Ec	Endothelzelle	PVN	
ECM	extrazelluläre Matrix		R:
ER	endoplasmatisches Retikulum		retrochiasmatische Region
eV	endo- oder/und exozytotische Vesikel	RCh	raues endoplasmatisches Retikulum
		rER	
G:			S:
GA	Glutaraldehyd	S	Synapse
gM	glatte Muskulatur	SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
gV	Golgi-Vesikel	SDR	Sprague-Dawley-Ratte
gS	Golgi-Stapel	SHR	spontan-hypertensive Ratte
		SFO	<i>Organum subformicale</i>
H:		SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	sV	kleine Vesikel (nur in Abb.56)
		sV	sekretorische Vesikel
J:			T:
Jc	Junction complex		axonale Terminale
		T	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
L:		TEM	Übergangs-endoplasmatisches Retikulum
L	Lysosom		Trans-Golgi-Netz
laC	laterale Zisterne des Golgi Apparats	tER	transgen-hypertensive Ratte
LM	Lichtmikroskopie	tG	Tight junction (<i>Zonula occludens</i>)
LSD	<i>Nucleus septalis lateralis</i> , dorsaler Teil	TGR	Tanyzytenfortsatz
LV	lateral Ventrikel (in LM)	TJ	Übergangsvesikel des tER
LV	große Vesikel (in TEM)	T _p	
		tV	
M:			V:
M	Mitochondrium		Vesikel
mA	muskulärer Arteriolen-Endast	V	ventrale <i>Commissura hippocampi</i>
ME	<i>Eminentia mediana</i>	vhC	
MnPO	<i>Nucleus medianus</i> der präoptischen Region	III.	3.Ventrikel
Mv	Mikrovilli		

I. EINLEITUNG

Angiotensine sind Peptide mit breitem Wirkungsspektrum. Der Begriff bezeichnet das Decapeptid Angiotensin I (ANG I) und seine physiologisch relevanten Derivate [Abb.1]. Sie werden im Blutkreislauf aus Angiotensinogen, welches in der Leber produziert wird, und dem Einfluss von Renin, dessen Ursprung in der Niere liegt, gebildet. Zusammengefasst werden Angiotensine, ihre Rezeptoren und alle an ihrer Entstehung und ihrem Abbau beteiligten Komponenten als Renin-Angiotensin-System (RAS) bezeichnet [52] [Abb.2].

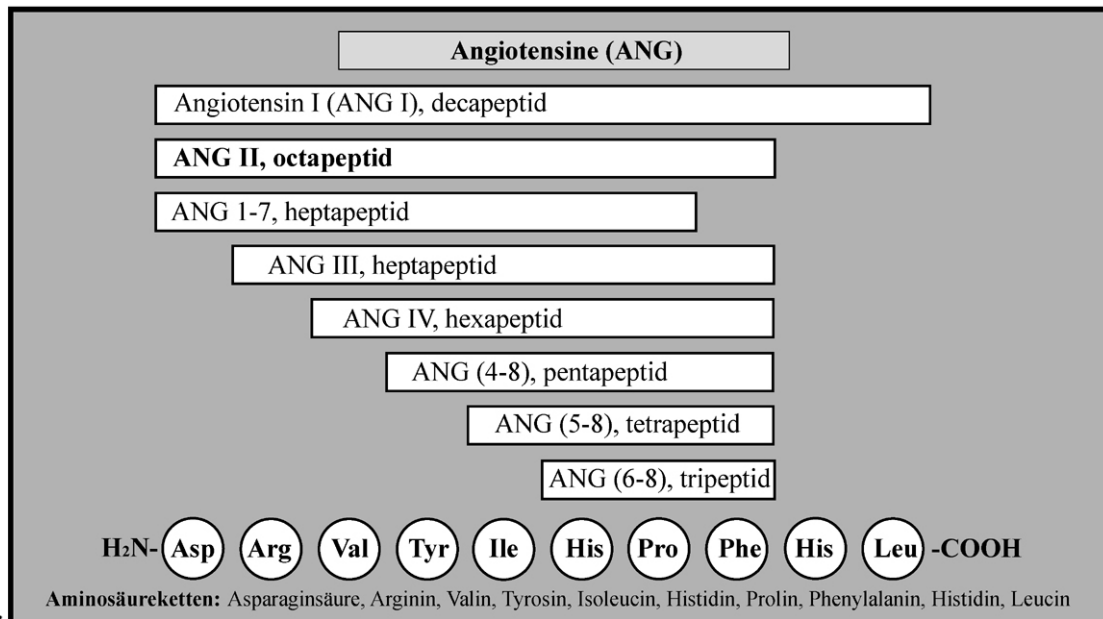


Abb. 1:

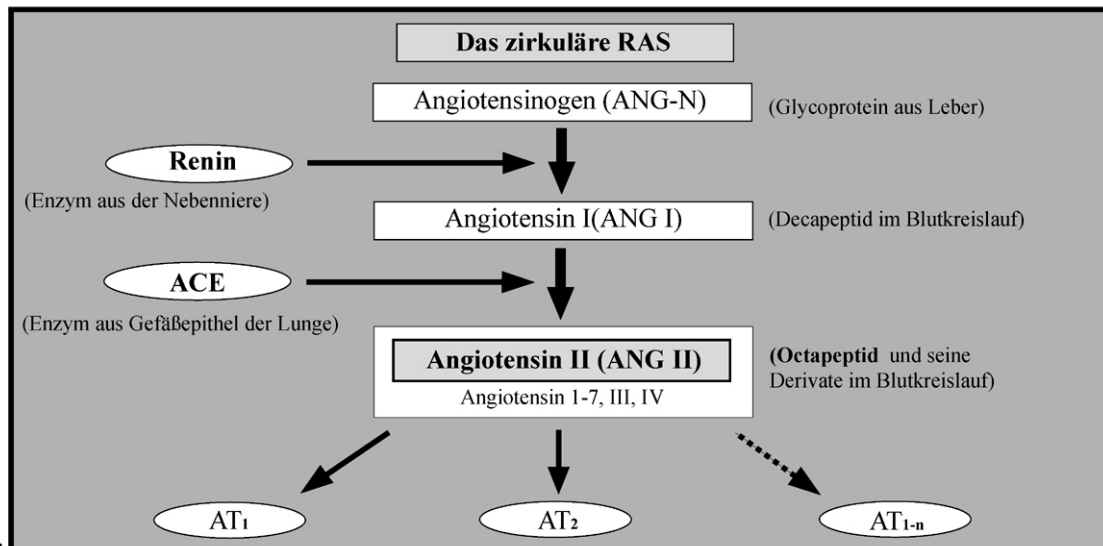


Abb. 2:

Abb. 1: Das Decapeptid Angiotensin I (ANG I) und seine Derivate.

Schematische Darstellung zeigt die Aminosäureketten der bisher bekannten Angiotensine. Das physiologisch aktivste Produkt des Renin-Angiotensin-Systems ist das Octapeptid Angiotensin II. Abbildung verändert nach H. Kobayash & Y. Takei, 1996 [52].

Abb. 2: Schematische Darstellung des peripheren Renin-Angiotensin-Systems.

Angiotensinogen wird in den Blutkreislauf abgegeben. Dort wird es durch Renin in ANG I gespalten. Das Konversionsenzym ACE spaltet zwei Aminosäuren von ANG I ab und ANG II entsteht. Dieses wird durch den Blutkreislauf transportiert und wirkt auf seine AT₁ und AT₂-Rezeptoren in der Gefäßwand oder wird in seine Derivate zerlegt, welche auf Subtypen des Rezeptors wirken können. Abbildung verändert nach H. Kobayash & Y. Takei, 1996 [52].

Das Octapeptid Angiotensin II (ANG II) ist das physiologisch aktivste Produkt des RAS [Abb.3]. Als Vasokonstriktor ist es maßgeblich an der Modulation des Blutdrucks beteiligt und somit in das Interesse der Hypertonieforschung gerückt [52, 88].

Überdies spielt ANG II eine wichtige Rolle in Ausschüttung von Vasopressin und Hypophysenhormonen und beeinflusst als Osmoregulator das Verlangen nach ‚Salz‘ und Flüssigkeit [16, 27, 66, 90]. Außerdem wird seine Beteiligung in der Wachstumssteuerung vermutet¹ [52] [Abb.4].

In den letzten Jahren konnte eine Reihe von Angiotensinrezeptoren (AT₁₋₄) sowie diverse Subtypen (z.B. AT_{1A} und AT_{1B}) beschrieben werden [3, 104, 132]. Ihre Zuordnung zu den einzelnen Angiotensinen sowie ihre Funktionen sind allerdings noch Gegenstand einer lebhaften Diskussion. Die Rezeptortypen AT₁ und AT₂ standen lange Zeit im Blickpunkt der Forschung um das Hormon ANG II², so dass die Frage nach ihren Aufgaben weitestgehend als beantwortet gilt. Studien konnten nachweisen, dass sowohl die Modulation des Blutdrucks, als auch die Ausschüttung von Vasopressin ausschließlich von ANG II (AT₁)-Rezeptoren vermittelt wird [11, 29, 67]. Dem ANG II (AT₂)-Rezeptor wird dagegen die Vermittlung von ‚Salz‘- und Flüssigkeitsverlangen, sowie eine Mitwirkung in der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung zugesprochen [26, 52, 104] [Abb.4].

Die Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gilt als gesichert, dass ANG II bei der Bindung an seinen Zellmembranständigen Rezeptor schnelle (klassische) Signaltransduktionskaskaden auslöst. Weitere, intrazelluläre, durch den AT₁-Rezeptor vermittelte Wirkungen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Jüngste Forschungsergebnisse machen es wahrscheinlich, dass ANG II in einem Hormon/Rezeptor-Komplex in die Zelle aufgenommen wird [129]. In der Zelle kann ANG II dann auf zytosolische AT-Rezeptoren wirken oder zum Zellkern verbracht werden, wo es vielleicht auf der Ebene der Genexpression wirkt. Ein Transport zu Orten der Speicherung, des Abbaus oder der erneuten Ausschleusung aus der Zelle ist ebenfalls denkbar. Die intrazellulären Effekte, welcher der Endozytose des Hormon/Rezeptor-Komplexes folgen, sind vermutlich modulatorischer und längerfristiger Natur, jedoch noch weitestgehend unklar [Abb.5].

¹ Neben ANG II wird auch seinen Derivaten ANG 1-7 und ANG III eine Affinität zum AT₁-Rezeptor zugesprochen. Die meisten Autoren führen ANG II aber als den physiologisch wichtigsten Wirkstoff des RAS an.

² AT₁- und AT₂-Rezeptoren sind am längsten Objekte der RAS-Forschung. In zahlreichen Studien mit ANG II-Antagonisten konnten ihre unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen werden. Alle weiteren Rezeptoren sind momentan noch Gegenstand der Forschung und ihre Funktionen sind noch nicht hinreichend geklärt.

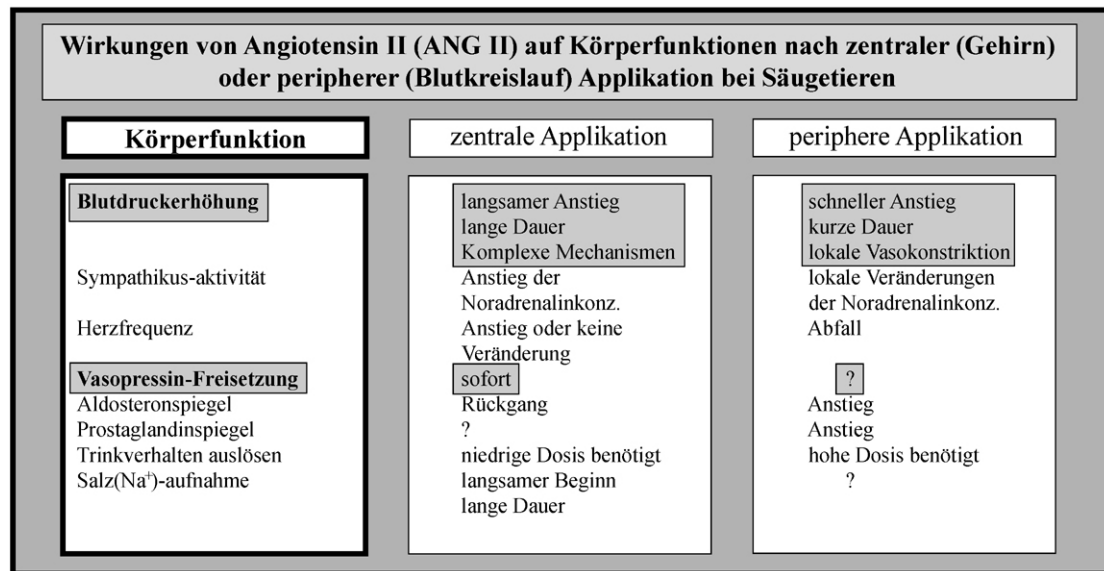


Abb. 3: Wirkungen von Angiotensin II auf die Körperfunktionen nach Applikation ins Gehirn und in den Blutkreislauf. Die Applikation ins zentrale RAS (Gehirn) zieht einen langsamen Anstieg des Blutdrucks nach sich. Dieser ist jedoch von längerer Dauer als der durch periphere Applikation von ANG II induzierte Blutdruckanstieg, welcher durch lokale Vasokonstriktion der betroffenen Gefäße erfolgt. Die Mechanismen und Kommunikationsprozesse, die als Reaktion auf die zentrale Applikation von ANG II folgen, sind zurzeit noch unbekannt. Der zentralen Applikation von ANG II folgt eine sofortige Freisetzung von Vasopressin. Die Effekte einer peripheren Applikation auf die Freisetzung von Vasopressin konnten noch nicht aufgezeigt werden. Abbildung verändert nach H. Kobayash & Y. Takei, 1996 [52].

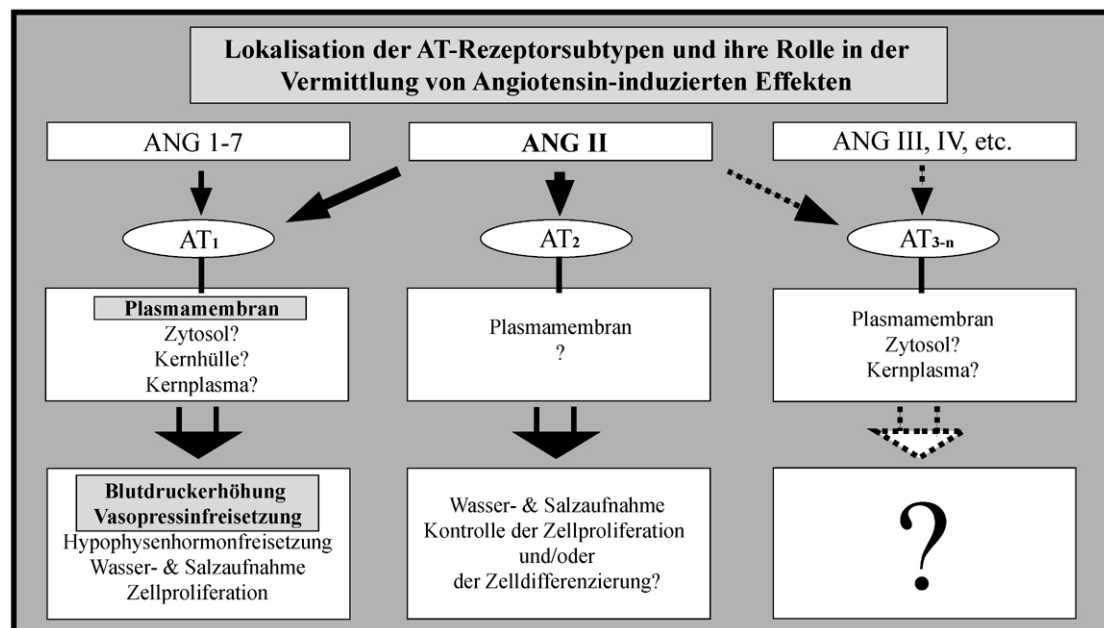


Abb. 4: Subzelluläre Lokalisation der AT-Rezeptoren und die Funktion der einzelnen Subtypen in der Effektvermittlung der Angiotensinderivate.

ANG II ist das physiologisch aktivste Produkt des RAS. Seine Effekte werden über seine AT₁- und AT₂-Rezeptoren vermittelt. Seine Affinität zu anderen Subtypen des AT-Rezeptors ist unklar. ANG 1-7 wirkt auf die Freisetzung von Vasopressin und Hypophysenhormonen und ist in der Neuromodulation der stärkste Konkurrent von ANG II. Der Effekt von ANG 1-7 wird über den Subtyp AT₁ vermittelt. Die Affinität von ANG III und IV gegenüber den AT₁- und AT₂-Subtypen ist geringer als die von ANG II und ANG 1-7. Ihre Wirkung auf weitere Subtypen ist unklar. AT₁- und AT₂-Rezeptoren konnten sicher in der Zellmembran verschiedener Zelltypen nachgewiesen werden. Andere Subtypen des Rezeptors (AT_{3-n}) sind wahrscheinlich ebenfalls in der Zellmembran vorhanden. Weitere AT₁-Rezeptoren werden im Zytosol, in der Kernhülle und im Kernplasma vermutet. Der AT₁-Typ vermittelt exklusiv die Effekte auf den Blutdruck, und die Vasopressin- und Hypophysenhormonfreisetzung, währenddessen die Wasser- und Salzaufnahme sowie die Zellproliferation beiden Rezeptorsubtypen zugesprochen wird. Abbildung verändert nach H. Kobayash & Y. Takei, 1996 [52].

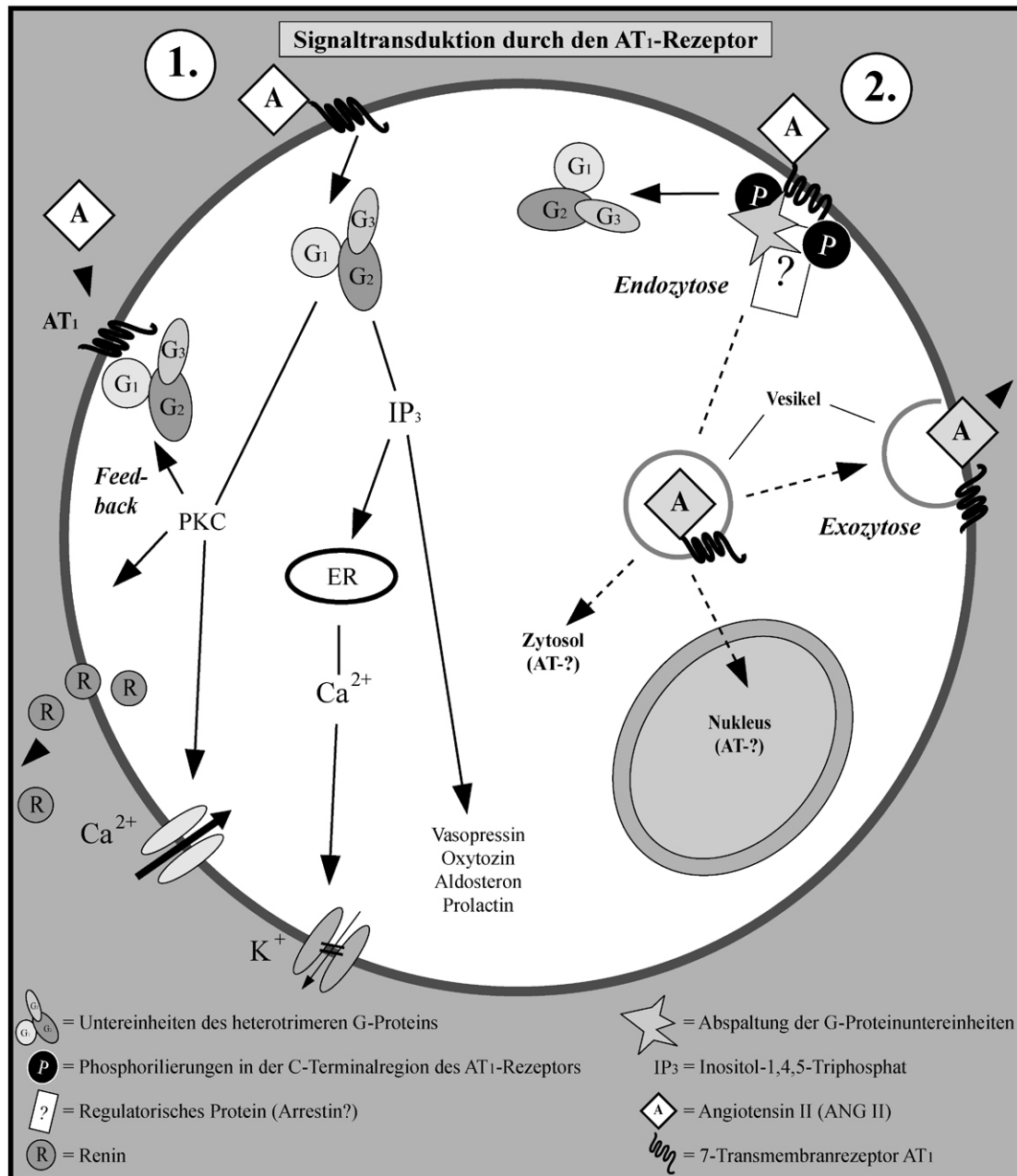


Abb. 5: Schematische Darstellung der Signalübertragungswege durch den AT₁-Rezeptor.

(1.) ANG II bindet an seinen G-Protein-assozierten Transmembranrezeptor, löst eine Konformationsänderung aus und induziert unter Abspaltung der G-Proteinuntereinheiten zwei Signaltransduktionskaskaden. Eine Kaskade führt über die Protein Kinase C (PKC) zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle, zu einer Freisetzung von Renin (durch Aktivierung der Prostaglandinsynthese) sowie zu einer Regulierung der AT₁-Rezeptoren (Feedback-Funktion?). Die andere Kaskade bewirkt über Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) am endoplasmatischen Retikulum einen Kalziumausschüttung, die den Kaliumaustritt aus der Zelle hemmt. Des Weiteren aktiviert IP₃ die Synthese und Sekretion von Vasopressin, Oxytozin, Aldosteron und Prolactin. Vasopressin ist beteiligt an der Erhöhung des Blutdrucks und an der Kontrolle von Hypophysenhormonen, während Aldosteron auf die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts wirkt und die Rückresorption von Natrium kontrolliert.

(2.) Alternativ zur klassischen Signalvermittlung in der Zelle könnte ANG II auch in einem Hormon/Rezeptor-Komplex internalisiert werden. ANG II bindet an seinen AT₁-Rezeptor und wird unter Abspaltung der G-Proteinuntereinheiten in einem Hormon/Rezeptor-Komplex in die Zelle eingeschleust (Endozytose). ANG II und der AT₁-Rezeptor werden dann vesikelgebunden durch das Zytosol transportiert. ANG II könnte so auf Rezeptoren im Zytosol wirken und dort Signaltransduktionskaskaden auszulösen. Darüber hinaus könnte ANG II zur Kernhülle transportiert werden, wo es vermutlich ins Kernplasma eingeschleust wird, um auf der Ebene des Kerns zu wirken. Vesikelgebunden könnte ANG II auch zu den Orten seiner Speicherung, seines Abbaus oder seiner Ausschleusung aus der Zelle gelangen. Der AT₁-Rezeptor kann auf diesem Wege ebenfalls zur Kernhülle transportiert werden, wo er vermutlich in die Membran inkorporiert wird. Alternativ könnte sein Transport auch dem Abbau oder einer erneuten Einbringung (Recycling) in die Zellmembran dienen. Abbildung erweitert nach W.G. Thomas, 1999 [129].

Ob und inwieweit Angiotensin II und seine Derivate (z.B. ANG 1-7 oder ANG III) eine hohe Affinität zu den AT₁-Rezeptoren besitzen und worin ihre physiologische Bedeutung liegt, ist bis heute noch strittig [52]. Darüber hinaus machen jüngste Forschungsergebnisse die Existenz lokaler RAS in verschiedenen Organen, neben dem RAS im Blutkreislauf, wahrscheinlich [Abb.6A].

So konnten beispielsweise im Gehirn RAS-Komponenten identifiziert werden, die auf räumlich begrenzte RAS schließen lassen [52] [Abb.6B]. Ob und inwiefern diese lokalen Systeme mit dem peripheren Kreislauf-RAS interagieren, ist zurzeit Gegenstand der Forschung. Vermutet wird, dass das zentrale Gehirn-RAS eine Rolle als Modulator der ANG II-induzierten Hypertonie und kardialen Hypertrophie spielt [6]. Die Frage nach seiner Funktion, bzw. nach den Synthese- und Transportwegen des Gehirn-RAS konnte allerdings noch nicht hinreichend beantwortet werden.

Viele der von ANG II beeinflussten physiologischen Funktionen zeigen eine klare Tag/Nacht-Variation. Besonders aber die 24 Stunden-Rhythmik des Blutdruckes lenkte die Aufmerksamkeit der medizinischen und pharmakologischen Hypertonie- bzw. RAS-Forschung auf den *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus.

Der SCN repräsentiert den zentralen Schrittmacher der circadianen³ Uhr der Säugetiere. Die beiden bilateral symmetrisch angelegten Kernareale liegen über der Sehnervenkreuzung, dem *Chiasma opticum* und beinhalten je 10.000 - 20.000 Neurone [51, 75] [Abb.7]. Der SCN kontrolliert den Schlaf/Wach-Zyklus, den circadianen Rhythmus des Blutdrucks [134], sowie die zeitliche Organisation vieler physiologischer und endokriner Funktionen in Säugetieren [74].

Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen SCN und RAS gewann mit der Entwicklung eines transgen-hypertensiven Rattenstammes (TGR(mREN2)27) für die Hypertonieforschung neue Bedeutung. Die Tatsache, dass die Blutdruckrhythmik dieser Ratten in der Phasenlage entgegengesetzt zur Phasenlage von Herzfrequenz und Aktivität verschoben ist, konnte erstmalig 1993 beschrieben werden [55]. Die Hypertonie wird durch das zusätzliche und zudem noch übermäßig exprimierte Mäuse-Renin2-Gen im RAS dieser Ratten verursacht. Die genauen Funktionswege, die zur entgegengesetzt phasenverschobenen Hypertonie führen sind bisher noch unklar, es gilt aber als wahrscheinlich, dass das Octapeptid ANG II eine wichtige Rolle in dieser und anderen Formen der Hypertonie spielt.

³ Lat.: Circa = ungefähr; dies = Tag

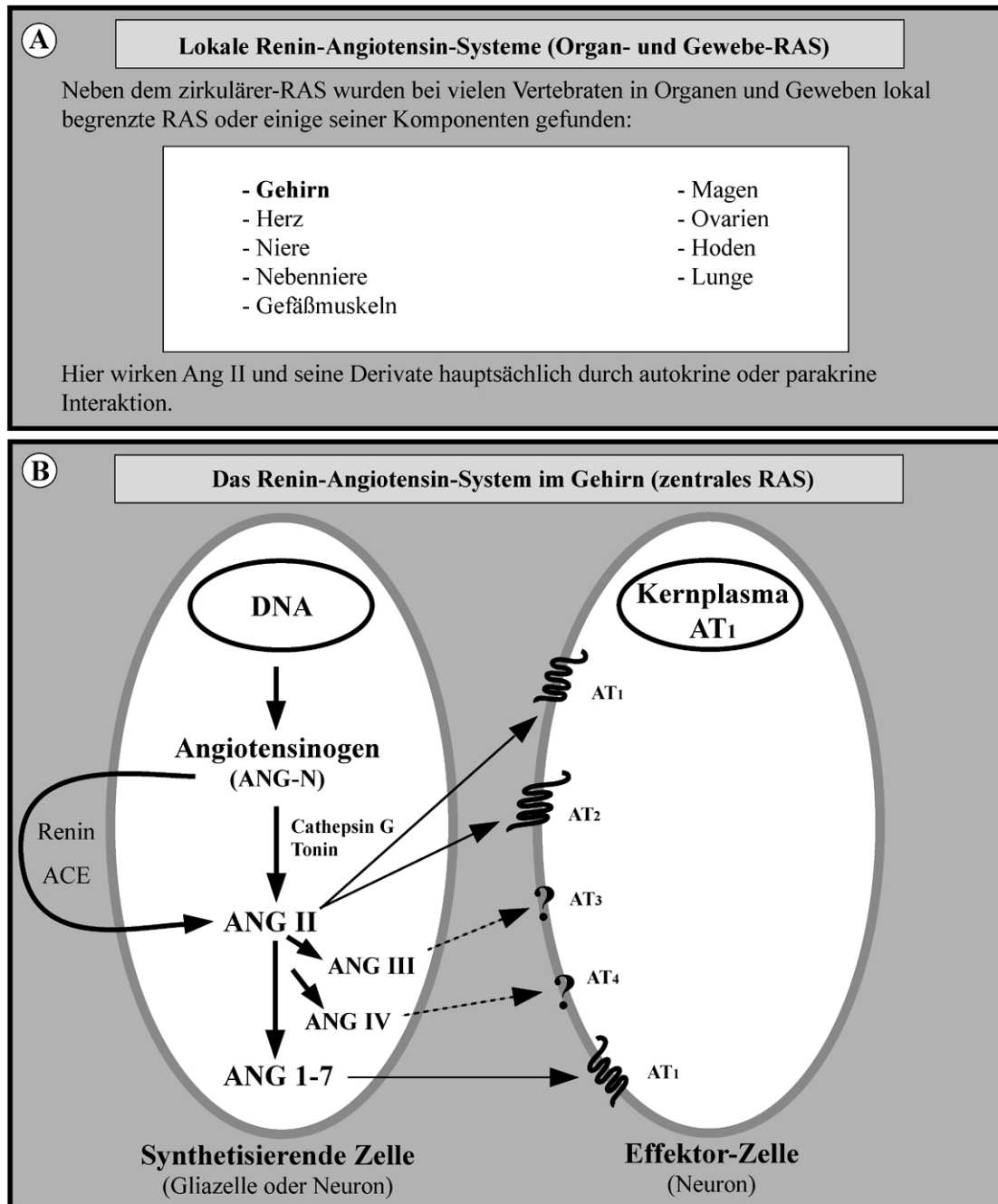


Abb. 6: Lokale Renin-Angiotensin-Systeme.

(A) In verschiedenen Organen und Geweben wurden RAS-Komponenten lokalisiert und auf die Existenz lokal wirkender RAS geschlossen. (B) Schematische Darstellung der RAS-Komponenten und ihrer Produktionsmechanismen im Gehirn. Angiotensinogen (ANG-N) wird in Gliazellen und Neuronen gebildet und extrazellulär durch Renin in ANG I gespalten. Dieses wird extrazellulär von einem Konversionsenzym (ACE) in ANG II gespalten, das von den Zellen wieder aufgenommen werden kann. Intrazellulär kann ANG-N direkt durch Cathepsin G oder Tonin in ANG II gespalten werden. ANG II wirkt dann auf AT₁- bzw. AT₂-Rezeptoren der Effektor-Zellen (Neurone) oder wird in seine Derivate abgebaut, die ihrerseits vermutlich (gestrichelte Linien) auf andere transmembrane AT-Rezeptoren wirken. Die Subtypen AT₃ und AT₄ konnten bereits identifiziert werden, ihre Funktionen sind jedoch noch weitgehend unbekannt. ANG 1-7 wirkt ebenfalls auf AT₁-Rezeptoren. Deren Affinität gegenüber ANG II soll allerdings größer sein als die für ANG 1-7. Abbildung (A) verändert nach H. Kobayash & Y. Takei, 1996 [52]. Abbildung (B) verändert nach M.I. Phillips, 1998 [90].

Heute gelten die TGR(mREN2)27 Ratten (TGR) als das Modelltier der menschlichen sekundären Hypertonie und sind seit mehreren Jahren Versuchstiere für pharmakologische, molekularbiologische und telemetrische Studien [57, 58].

Untersuchungen am SCN von TGR und normotensiven (Sprague-Dawley) Ratten (SDR) konnten den Einfluss des Transgens auf die c-fos mRNA und das kardiovaskuläre System aufzeigen [56]. Gleichfalls konnte in Läsionsexperimenten die Kontrolle der Blutdruckrhythmik durch den SCN sowohl bei transgen-hypertensiven Ratten, als auch in normotensiven Kontrollen erfolgreich nachgewiesen werden [134].

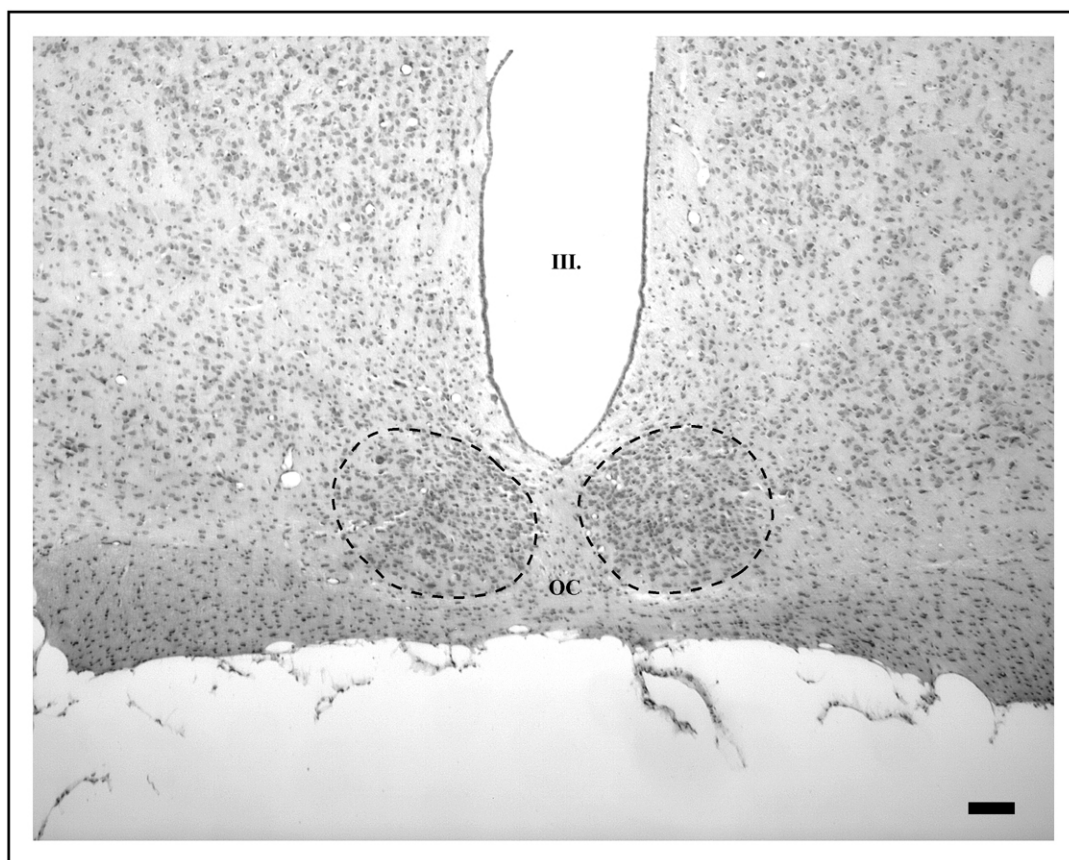


Abb.7: Der *Nucleus suprachiasmaticus* des Hypothalamus (SCN) ist der Sitz des zentralen Schrittmachers der circadianen Rhythmik der Säugetiere. Eine Methylenblaufärbung zeigt die zwei bilateral symmetrisch angelegten Kerngebiete des SCN (gestrichelte Linien) oberhalb der Sehnervenkreuzung (*Chiasma opticum*, OC) und unterhalb des 3.Ventrikels (III.).

Alle bisherigen Befunde lassen auf eine enge Beziehung des RAS mit dem SCN schließen. Gleichfalls ist anzunehmen, dass die phasenverschobene Rhythmik der transgen-hypertensiven Tiere durch pathologische Veränderungen in dieser Beziehung hervorgerufen wird. Ob es sich hierbei um Veränderungen einzelner RAS-Komponenten im gesamten Organismus oder nur im SCN handelt (z.B. Anzahl und Lokalisation der AT₁-Rezeptoren im SCN), ist momentan unklar.

ANG II wurde auf lichtmikroskopischer Ebene im SCN von C57/6J Mäusen bereits beschrieben, aber nicht durch Photographien belegt [1]. Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurden Angiotensine in hypothalamischen Blutgefäßen und in deren unmittelbarer Umgebung gezeigt [4]. Darüber hinaus konnten Angiotensine in neuronalen Strukturen des Hypothalamus [80], des *Nucleus hypoglossus* [124], des *Organum subfornicale* [92] und des *Nucleus centralis amygdalae* [85] beschrieben werden. Eine Darstellung von ANG II im SCN auf ultrastruktureller Ebene ist bis jetzt allerdings noch nicht gelungen.

Autoradiographische Studien und Radioligand-Bindungs-Methoden konnten den AT₁-Rezeptor im SCN von Maus [39, 49] und Ratte [30] darstellen. Berichte über immunhistologische Studien, welche eine höhere Sensitivität, Spezifität und räumliche Auflösung gewährleisten, sind momentan nicht vorhanden bzw. beschreiben die AT₁-IR im SCN von normotensiven Sprague-Dawley Ratten als ausgesprochen schwach, ohne diese jedoch durch Photographien zu belegen [31]. Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte der AT₁-Rezeptor nur begrenzt an Blutgefäßen des Hypothalamus [4] und in der Nebenniere [31] dargestellt werden. Außerdem gelang sein Nachweis in neuronalen Strukturen des Hypothalamus [80] und des *Nucleus hypoglossus* [124]. Informationen zur ultrastrukturellen Lokalisation des AT₁-Rezeptors im SCN sind weder bei normotensiven noch bei transgen- oder spontan-hypertensiven Ratten verfügbar. Das heißt, notwendige Informationen über etwaige pathologische Veränderungen des SCN, bzw. des RAS im SCN von transgen-hypertensiven Tieren liegen demzufolge nicht vor.

Um pharmakologische, molekularbiologische und telemetrische Befunde zum RAS im SCN von transgen-hypertensiven Ratten und normotensiven Kontrollen verlässlich zu interpretieren ist es jedoch wichtig, diese Ergebnisse mit einer licht- und elektronenmikroskopischen Datenbasis zu korrelieren.

I.1 Fragestellung

Nach dem aktuellen Stand der Forschung bleibt demnach ein dreiteiliger zentraler Fragenkomplex offen, dessen Beantwortung zum grundlegenden Verständnis der Beziehung von RAS und SCN unentbehrlich ist:

> 1. Existiert ein lokales RAS im SCN? Wenn ja, wie funktioniert es?

Die Frage nach der Existenz eines lokalen RAS im SCN definiert die zentralen Ziele dieser Arbeit.

(A) Innerhalb der Promotionsarbeit soll eine immunhistologische Methode zur Darstellung von Komponenten des RAS im SCN auf elektronenmikroskopischer Ebene entwickelt werden. Die zu entwickelnde Technik soll als Basis für zukünftige Vergleichsstudien im SCN von normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten dienen, aber auch durch weiterführende Methoden, wie Doppelmarkierungen und Silberintensivierungen, erweiterbar sein.

(B) Die entwickelte Methode soll im SCN von normotensiven SDR, welche als Kontrolltiere der TGR gelten, getestet werden. Hierzu soll das Octapeptid Hormon ANG II und seine AT₁-Rezeptoren auf ultrastruktureller Ebene in den Endothelien von SCN-Kapillaren und im SCN-Neuropil sichtbar gemacht werden.

> 2. Verfügt der SCN über Kommunikationswege zum zirkulierenden RAS oder zu anderen ANG II-rezeptiven Kerngebieten im Gehirn?

Mit immunhistologischen Techniken sollen der SCN von normotensiven SDR, seine direkte Umgebung sowie Kerngebiete vor und hinter der funktionellen Blut/Hirn-Schranke mit mutmaßlichen angiotensin-haltigen Verbindungen zum SCN auf ihre AT₁-Rezeptor-Immunreaktivität auf lichtmikroskopischer Ebene untersucht werden.

> 3. Verursacht das Transgen der TGR(mREN2)27 eine pathologische Veränderung im RAS des SCN und/oder in den Kommunikationswegen zum zirkulierenden RAS bzw. zu ANG II-sensitiven Kerngebieten?

Die Frage nach möglichen Veränderungen im Gehirn-RAS des SCN bzw. in Kerngebieten mit und ohne direkten Zugang zum Zirkulations-RAS sowie deren neuronale Verbindungen zum SCN gibt das Nebenziel dieser Arbeit vor.

In der Annahme, dass das Blutdruckniveau mit der Konzentration von ANG II in Zirkulation und Gehirn korreliert ist, sind maximale Unterschiede in den ANG II-Konzentrationen zwischen transgen-hypertensiven TGR und normotensiven SDR in der Ruhephase der Tiere zu erwarten. Hier erfährt der Blutdruck der TGR sein höchstes, der Blutdruck der SDR dagegen sein niedrigstes Niveau. Etwaige Unterschiede in der ANG II-Konzentration sollten sich somit in der Dichte und der Verteilung seiner AT₁-Rezeptoren in Arealen vor der Blut/Hirn-Schranke besonders deutlich widerspiegeln. Beeinflusst die erhöhte Konzentration von ANG II in der Zirkulation bei TGR auch die ANG II-Konzentration im Gehirn, so sollten etwaige Veränderungen auch in Hirnarealen hinter der Blut/Hirn-Schranke (z.B. SCN) anhand der AT₁-Rezeptordichte und ihrer Verteilung messbar sein.

Unter Anwendung der gleichen immunhistologischen Techniken sollen bei TGR mögliche Auswirkungen der in der Zirkulation erhöhten ANG II-Konzentration auf die Dichte und Verteilung der AT₁-Rezeptoren in Kerngebieten vor und hinter der funktionellen Blut/Hirn-Schranke aufgezeigt werden.

Hierzu sollen neben dem SCN zwei Zirkumventrikularorgane (*Organum vasculosum lamina terminalis* und *Organum subfornicale*), die vor der Blut/Hirn-Schranke liegen sowie der *Plexus choroideus* mit einem semipermeablen Gefäßsystem als potenzielle Zielareale für weiterführende immunhistologische Studien auf ultrastruktureller Ebene untersucht werden.

II. MATERIAL & METHODE

Die folgende Methodendarstellung beschreibt detailliert sowohl die verwendeten Versuchstiere und Chemikalien, als auch die zur Erstellung aller immunhistologischen Präparate durchgeführten Arbeitsschritte. Ferner bietet dieses Kapitel einen umfassenden Überblick über technische Probleme und deren Lösungen.

Die Protokolle zur Herstellung von licht- und elektronenmikroskopischen Präparaten werden im Anschluss in Textform wiedergegeben und sind in tabellarischer Form zusätzlich im Anhang dieser Arbeit zu finden [Tabelle 2-5].

II.1. Versuchstiere

Zur Überprüfung der Antikörpertauglichkeit und zur Entwicklung der licht- und elektronenmikroskopischen Techniken wurden sechs 10 Wochen alte Wistar Ratten [Aventis AG, Frankfurt am Main] verwendet.

Nach Abschluss der Testphase wurden für die Licht- und Elektronenmikroskopie jeweils sechs 10 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten [Moellegaard, Dänemark] ausgewählt. Parallel hierzu standen zu der lichtmikroskopischen Vergleichsstudie sechs 10 Wochen alte transgenhypertensive TGR(mREN2)27 Ratten [Moellegaard, Dänemark] zur Verfügung⁴. Die Versuchstiere wurden ohne Ausnahme in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Regime ohne simulierte Dämmerung gehalten.

II.2 Verwendete Antikörper

II.2.1 Primärantikörper

II.2.1.1 ANG II (AT₁)-Rezeptorantikörper (sc 1173)

Der verwendete ANG II (AT₁)-Rezeptorantikörper ist ein gegen *Rabbit* (Kaninchen)⁵ gerichteter polyklonaler Antikörper menschlicher Herkunft. Der Hersteller hat den Antikörper detailliert charakterisiert und seine Spezifikationen sind unter der Produktnummer sc-1173 bei Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) einsehbar. Der Antikörper ist nicht kreuzreaktiv mit ANG II (AT₂)-Rezeptoren und wurde in einigen kürzlich veröffentlichten Studien erfolgreich eingesetzt [23, 65, 112]. Der ANG II (AT₁)-Rezeptorantikörper wurde aufgrund seiner Paraffingängigkeit sowohl auf licht-, als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene verwendet.

⁴ In diesem Forschungsprojekt wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

⁵ Aufgrund der besseren Geläufigkeit wird auf die englische Nomenklatur zurückgegriffen.

In der lichtmikroskopischen Studie an paraffineingebetteten Präparaten wurde der Antikörper im Verhältnis 1:150 verdünnt, für den licht- und elektronenmikroskopischen Teil (Kunsthazeinbettung) im Verhältnis 1:750.

II.2.1.2 Angiotensin II-Antikörper (sc 7419)

Der zweite verwendete Antikörper ist ein gegen *Goat* (Ziegen) gerichteter polyklonaler Antikörper menschlicher Herkunft. Der Antikörper ist kreuzreaktiv mit ANG I und ANG II. Der Hersteller hat den Antikörper detailliert charakterisiert und seine Spezifikationen sind unter der Produktnummer sc-7419 bei Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) einsehbar. Der ANG I/II-Antikörper stellte sich als nicht paraffingängig heraus. Da keine alternativen Antikörper zur Verfügung standen, kam der ANG I/II-Antikörper nur auf elektronenmikroskopischer Ebene zum Einsatz. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:750 angewendet.

II.2.1.3 Vasopressinantikörper (AB 1565)

Chemicon International, Inc. (Temecula, CA) stellte den Vasopressinantikörper. Er ist ein gegen *Rabbit* gerichteter polyklonaler Antikörper menschlichen Herkunft. Die Spezifikationen sind unter der Produktnummer AB1565 über den Hersteller zu beziehen. Der Vasopressinantikörper diente nur zur Erstellung lichtmikroskopischer Präparate, hier wurde er im Verdünnungsverhältnis von 1:7500 eingesetzt.

II.2.2 Sekundärantikörper und Normalseren

Als Sekundärantikörper wurden folgende Produkte von Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) genutzt:

1. Biotinylierter Anti-*rabbit* IgG aus *Goat*, Katalognummer: BA-1000; Verdünnung 1:250.
2. Biotinylierter Anti-*goat* IgG aus *Rabbit*, Katalognummer: BA-5000; Verdünnung 1:250.

Vector Laboratories stellte ebenfalls die Normalseren:

1. Normal *Goat* Serum, Katalognummer: S-1000; Verdünnung 1:10.
2. Normal *Rabbit* Serum, Katalognummer: S-5000; Verdünnung 1:10.

II.2.3 Kontrollversuche

Alle durchgeführten Experimente wurden von positiven und negativen Kontrollexperimenten begleitet. In positiven Kontrollexperimenten wurden die für AT₁-Rezeptoren, ANG I/II und

Vasopressin erzielten Antikörperreaktionen mit bereits aus der Literatur bekannten charakteristischen immunreaktiven Gebieten im Hypothalamus verglichen [25, 31, 32, 43, 50, 59, 87, 89].

Auf subzellulärer Ebene wurden die ersten immunhistologischen Ergebnisse⁶ der ANG I/II- und AT₁-Rezeptorantikörperreaktionen mit in der Literatur dargestellten ultrastrukturellen Bindungsstellen äquivalenter Antikörper verglichen [31, 50, 61, 80, 120].

Neben den standardisierten Negativkontrollen⁷ wurden der ANG I/II- und der AT₁-Rezeptorantikörper noch einem Test mit sog. ‚*blocking peptides*‘ unterzogen (Produktnummern, sc-7419, respektive sc-1173P, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), in dem die jeweilige Antikörperreaktionen erfolgreich unterbunden werden konnten.

II.3 Methodische Überlegungen zur Herstellung von Kunstharzpräparaten

Herausforderung und Ziel einer jeden immunhistologischen Arbeit ist die optimale Darstellung möglichst aller spezifischer Antikörperbindungsstellen in einer bis auf die ultrastrukturelle Ebene perfekt erhaltenen zellulären Umgebung. Jedem Histologen ist klar, dass hierbei Anspruch und Wirklichkeit bisweilen weit auseinanderklaffen. Heutige technische Möglichkeiten limitieren entweder die ultrastrukturelle Erhaltung des Präparates oder die Verfügbarkeit der gesuchten Antigene. Die Gratwanderung zwischen beiden Zielen wird auf absehbare Zeit ein manchmal unbefriedigender Kompromiss bleiben müssen. Nichtsdestotrotz, oder gerade deswegen, wurde auch in dieser Arbeit versucht, eine Methode zu entwickeln, die selbst kleinste Antikörperbindungsstellen auf subzellulärer Ebene sichtbar macht und dabei ein hohes Maß an ultrastruktureller Integrität des Gewebes gewährleistet.

Im folgenden Abschnitt werden drei Parameter der hier entwickelten Methode näher besprochen, die neben der Spezifität der verwendeten Antikörper, die Voraussetzung für jede erfolgreiche immunhistologische Anwendung sind, nämlich 1. die Fixierung, 2. die Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen und 3. die Eigenschaften der Antigen/Antikörper-Markierung.

Bedeutend für Gewebe- und Antigenerhaltung sind sowohl die Eigenschaften der Fixative, als auch die Dauer ihrer Einwirkung. Die in der lichtmikroskopischen Immunhistologie oft angewandten Fixative Paraformaldehyd (PFA) und Formol erreichen zwar eine gute Erhaltung der Antigene, sind in reiner Form für die elektronenmikroskopische Forschung

⁶ Veröffentlicht in M.A. Thomas, G. Fleissner, S. Hauptfleisch and B. Lemmer, Subcellular identification of angiotensin I/II- and ANG II(AT₁)-receptor-immunoreactivity in the central nervous system of rats, Brain Res. 962 (2003) 92-104.

⁷ Im Kontrollversuch wird der Sekundärantikörper ohne vorherigen Primärantikörper auf die Probe aufgebracht.

jedoch unbrauchbar, da das zu untersuchende Gewebe auf ultrastruktureller Ebene nur ungenügend konserviert wird. Glutaraldehyd (GA), ein gängiges Fixativ in der Elektronenmikroskopie, hingegen konserviert in reiner Form das Präparat zwar auch auf ultrastruktureller Ebene, verdeckt jedoch die gesuchten Antikörperbindungsstellen und dringt nur langsam in das Gewebe ein. Ein späteres Auswaschen von Glutaraldehyd durch Gerbsäure ist zwar möglich, erreicht aber nicht die gewünschten Resultate.

Um den bestmöglichen Kompromiss zu erzielen, wurde mit einer Mischung aus unterschiedlichen Fixativen und verschiedenen Fixierzeiten experimentiert. Ein Mischungsverhältnis aus 4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd und 0,2% Pikrinsäure (PiS) in 4°C kalten Phosphatpuffer stellte sich als die beste Fixiermischung heraus [Anwendungsdauer siehe Tabellen im Anhang].

Ein weiterer wichtiger Parameter in der immunhistologischen Arbeitstechnik ist die Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen, um auch solche Antigene zu erreichen, die hinter den Zellmembranen der Zellen positioniert sind. Auf lichtmikroskopischer Ebene wird die Durchlässigkeit von biologischen Membranen durch Detergenzien wie Triton-X und Saponin⁸ erreicht. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass beide Detergenzien auf ultrastruktureller Ebene deutliche Schäden und Spuren auf den elektronenmikroskopischen Präparaten hinterlassen [Abb.8]. Deswegen wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff ‚Schock gefroren‘, was sich als gute Alternative zur Behandlung mit klassischen Detergenzien erwies. Ein bedeutender Aspekt der entwickelten Technik lag des Weiteren in der Anforderung das Immunsignal der Antikörperreaktion sowohl auf licht- als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene sichtbar zu machen. Hiermit sollte eine unkomplizierte Lokalisation und Dokumentation lichtmikroskopischer Ergebnisse, sowie eine damit verbundene schnelle und sichere Identifizierung elektronenmikroskopisch interessanter Regionen, ermöglicht werden. Um dies zu gewährleisten, wurde ein sog. ‚pre-embedding-Verfahren‘ auf ca. 40 µm dicken Vibratomschnitten gewählt. Da Goldpartikel von lichtmikroskopisch gut sichtbarer Größe über zu wenig Eindringtiefe verfügen, wurde die klassische ABC-Methode mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid als Markierung angewandt.

Abb.8: Membranpermeabilisierung mit Detergenzien wie Triton führt zu ultrastrukturellen Beschädigungen der TEM-Proben. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines doppelt kontrastierten Ultradünnschnittes durch den Rattenhypothalamus. (B) Ausschnittsvergrößerung von (A; Rahmen in A). Die Behandlung mit Triton überzieht die Probe mit einem feinen Niederschlag, der die zellulären Strukturen etwas dunkler erscheinen lässt als üblich. Darüber hinaus erscheinen die Kernhüllen (weiße Pfeile in B) und Zellmembranen von Mitochondrien (offene Pfeile in B) aufgelöst. Des Weiteren zeigt sich ein Zerfall der axonalen Myelinscheiden (weiße Pfeilspitzen in B). Abkürzungen: Ax, Axon; M, Mitochondrien; N, Nucleus. Balken in (A und B) entsprechen 0,5 µm. >

⁸ Detergenzien; Seifenartige Lösungen, welche die Doppellipidstruktur der Zellmembranen aufbrechen können.

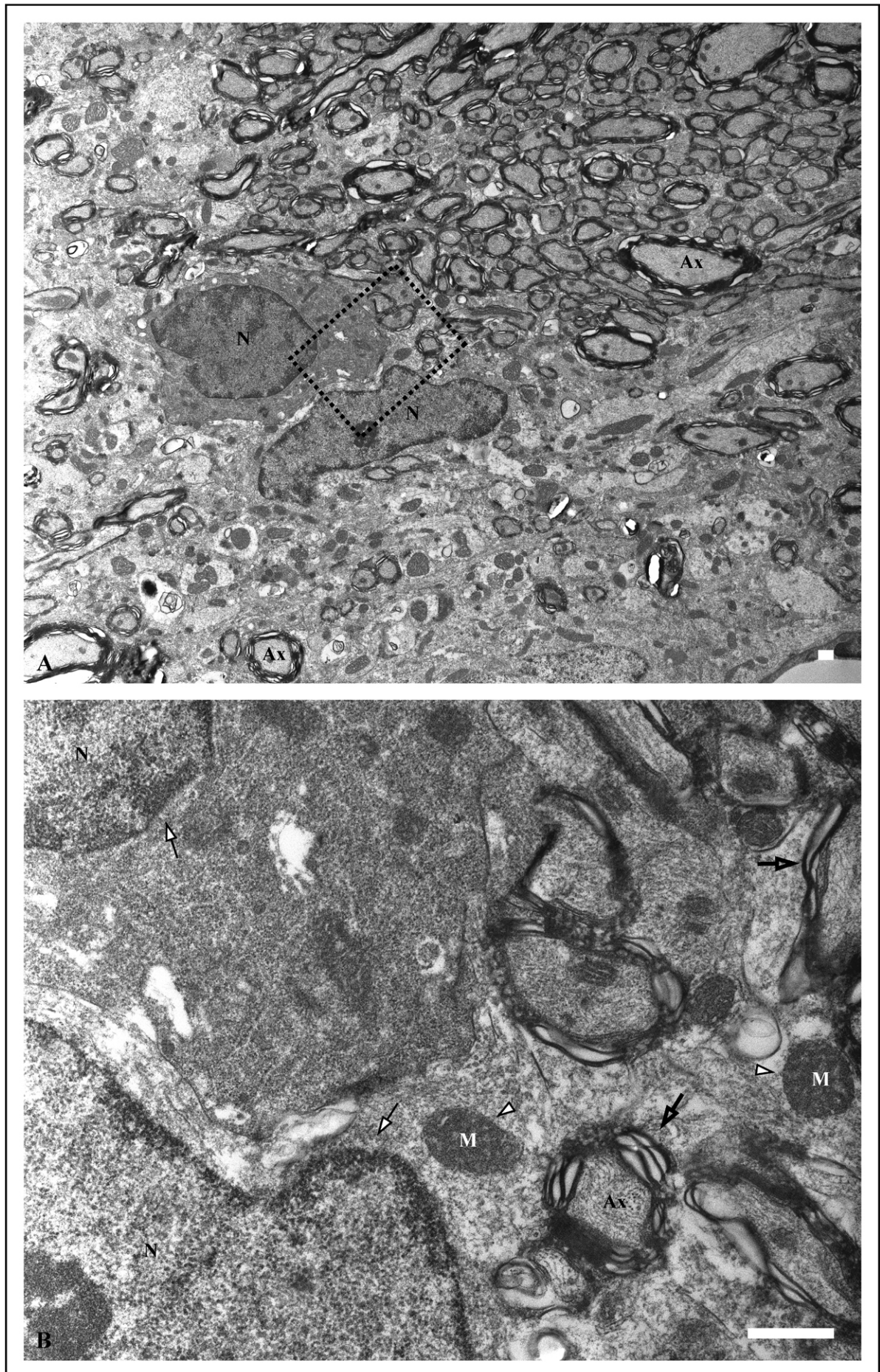


Abb.8:

DAB ist als Farbstoff sowohl im Licht-, als auch im Elektronenmikroskop eindeutig zu identifizieren und ist somit trotz seiner Giftigkeit eine gute Alternative zu Goldmarkierungen. Der Einsatz von größeren Goldpartikeln auf der Oberfläche von Kunstharz eingebetteten Schnittpräparaten (*on section post-embedding*-Technik) kam aufgrund der geringen Größe solcher Semidünnschnitte nicht in Frage, da hier keine großflächige Orientierung im Lichtmikroskop möglich ist. Silberintensivierungen von kleinen Goldpartikeln sind zwar möglich, bringen aber weitere Arbeitsschritte mit sich und können zusätzlich ultrastrukturelle Details verdecken, sodass die Anwendung von Goldmarkierungen normalerweise bei Doppelfärbungen ihren größten Nutzen findet und hier nicht zur Anwendung kam.

II.4. Protokoll der Immunhistologie an Paraffinpräparaten

Die Arbeitsschritte für die immunhistologischen Färbungen des ANG II (AT₁)-Rezeptor- und des Vasopressinantikörpers werden hier zusammen in einem Protokoll wiedergegeben. Da Normalseren und Sekundärantikörper für beide Primärantikörper gleich sind, unterscheiden sich beide Immunfärbungen nur in der Verdünnung und der Einwirkzeit des primären Antikörpers. Chemikalienansätze und Verdünnungen sind der vollständigen Protokollführung im Anhang zu entnehmen [Tabelle 2 und 3].

Für den lichtmikroskopischen Teil der Studie wurden die Versuchstiere mit Enfluran (Ethrane, Abbott GmbH & CoKG, Wiesbaden) anästhesiert und 10 min transkardial mit kaltem (4°C) 0,1 M Phosphatpuffer (PB) + 0,1% Liquemin (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) perfundiert. Danach folgte eine 20-30 min dauernde Perfusion⁹ mit einer kalten (4°C) 4% Paraformaldehydlösung (PFA). Nach der Entnahme der Gehirne wurden diese coronal in 4-5 mm dicke Blöcke geschnitten, für 12 h in 4% PFA nachfixiert und dann in 0,1 M PB ausgewaschen. Danach erfolgte die Dehydrierung der ausgesuchten Blöcke in einer aufsteigenden Alkoholreihe, sowie ihre Einbettung in Paraffin (Paraplast, Sigma Aldrich).

Mit einem Schlittenmikrotom (Leica) wurden später coronale Paraffinschnitte (10 µm) angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach der Entparaffinierung erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen¹⁰ mit 0,3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Nach mehrfachen Spülvorgängen mit salzhaltigem Phosphatpuffer (PBS), bzw. PBS mit Triton-X, folgte die Präinkubation in 10% Normalserum für 1 h bei Raumtemperatur (RT), bevor die Schnitte im primären Antikörper bei RT 18 h (AT₁), bzw. 12 h (Vaso) inkubiert wurden. Nach mehrmaligem Auswaschen mit PBS + Triton-X wurde der Sekundärantikörper bei RT für 2 h aufgebracht. Nach weiteren Spülvorgängen mit reinem PBS erfolgte die Inkubation in der Avidin/Biotin-Lösung (Vectastain Elite ABC-kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) für 90 min bei RT. Danach wurden

⁹ Die Perfusion der Versuchstiere spült Erythrozyten aus den Blutgefäßen und ermöglicht eine Durchdringung der Organe durch das Fixativ aus dem Inneren.

¹⁰ Endogene Peroxidasen können das Substrat der Antikörpermarkierung (DAB) oxidieren und so die Interpretation der Antigen/Antikörper-Reaktion erschweren.

die Präparate in PBS und einer Tris/HCl-Lösung gespült und die Immunreaktion mit DAB und H₂O₂ sichtbar gemacht.

II.5 Protokoll der Immunhistologie an Kunstharzpräparaten

Die Arbeitsschritte für die immunhistologische Färbungen des ANG I/II-Antikörpers, sowie des ANG II (AT₁)-Rezeptorantikörpers werden hier zusammen in einem gemeinsamen Protokoll wiedergegeben. Beide Immunfärbungen unterscheiden sich nur in den verwendeten Sekundärantikörpern und ihren Normalseren. Verdünnung und Einwirkzeit der beiden primären Antikörper sind identisch. Alle Chemikalienansätze und Verdünnungen können der vollständigen Protokollführung im Anhang entnommen werden [siehe Tabelle 4-5].

Für den elektronenmikroskopischen Teil dieser Studie wurden die Versuchstiere mit Enfluran (Ethrane, Abbott GmbH & CoKG, Wiesbaden) anästhesiert und 10 min transkardial mit kaltem (4°C) 0,1 M Phosphatpuffer (PB) + 0,1% Liquemin (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) perfundiert. Danach folgte eine 20-30 min dauernde Perfusion mit kaltem (4°C) 4% PFA + 0,05% GA + 0,2% PiS. Nach der Entnahme der Gehirne wurden diese coronal in 4-5 mm dicke Blöcke geschnitten, für 7 h in 4% PFA + 0,05% GA + 0,2% PiS nachfixiert und dann in 0,1 M PB ausgewaschen. Danach wurden mit einem Vibratom (Lance, Division of Sherwood Medical, St. Louis) coronale Schnitte (40 µm) durch den gesamten Hypothalamus angefertigt und über Nacht bei 4°C in 0,1 M PB gespült.

Zum Schutz vor Gewebebeschädigungen durchliefen die Schnitte die Prozedur des ‚Schockgefrierens‘ erst nach einer 20 min dauernden Inkubation in 10% Saccharose. Bei den nachfolgenden Arbeitsschritten schwammen die Präparate frei in den jeweiligen Flüssigkeiten¹¹. Nach mehrfach wiederholten Waschvorgängen in kalten (4°C) PB wurden etwaige endogene Peroxidasen mit 0,3% H₂O₂ blockiert. Dann folgten weitere Spülvorgänge in PB und die Präinkubation in 10% Normalserum für 1 h bei RT. Im Anschluss wurden die Präparate in den jeweiligen Antikörper für 36 h bei 4°C inkubiert.

Nach mehrmaligem Ausspülen wurde der Sekundärantikörper bei RT für 3 h aufgebracht. Nach weiteren Waschvorgängen erfolgte die Inkubation in der Avidin/Biotin-Lösung (Vectastain Elite ABC-kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) für 2 h bei RT. Danach wurden die Präparate in Phosphatpuffer und Tris/HCl-Lösung gespült und die Immunreaktion mit DAB und H₂O₂ sichtbar gemacht.

II.6 Dokumentation der Flacheinbettung und Semi- / Ultra-Dünnschnittprotokolle

Nach wiederholtem Waschen in 4°C kaltem PB, folgte zur Nachfixierung und Färbung der Zellmembranen¹² eine Behandlung mit Osmiumtetroxid (OsO₄). Die Präparate wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und später über das Intermedium Propylenoxid bei RT in das Einbettmedium Araldit überführt.

¹¹ Als Eindringtiefe für Antikörper und DAB werden ca. 20 µm angenommen. Um das Eindringen von zwei Seiten zu gewährleisten, schwimmen die Präparate frei in den Antikörper- und Färbelösungen.

¹² Osmiumtetroxid reagiert mit den Lipiden der Plasmamembranen und färbt diese dunkel. Darüber hinaus verstärkt OsO₄ die DAB-Färbung.

Nach mehreren Versuchen gelang eine erfolgreiche Flacheinbettung letztlich zwischen einem Objektträger und einem von Gewichten beschwerten Kopierfolienstreifen¹³.

Im Anschluss an die Flacheinbettung wurden alle Präparate auf ihren Inhalt hin analysiert und interessante Proben¹⁴ nach ihrer Dokumentation an einem Mikrotom (Ultracut, Leica) semidünn geschnitten (2 µm). Nach einer weiteren Durchsicht wurden ausgewählte Semidünnschnitte auf einem Mikrotom (Ultracut-S, Leica) ultradünn geschnitten. Nach Aufzug der Präparate auf Pioloform befilmte ‚Lochgrids‘, erfolgte bei jedem zweiten Ultradünnschnitt¹⁵ eine Doppelkontrastierung mit 10% Uranylazetat und Bleizitrat für 10 min.

II.7 Färbungen mit Methylenblau

Zur besseren Identifizierung und Abgrenzung der gesuchten Hirnareale, wurde innerhalb der Paraffin- und Semidünnschnittserien jeder zehnte Schnitt mit einer Methylenblaulösungen angefärbt. Das entsprechende Protokoll ist der Tabelle im Anhang zu entnehmen [Tabelle 6].

II. 8 Dokumentation licht- und elektronenmikroskopischer Ergebnisse

Lichtmikroskopische Präparate (Paraffin-, Vibratom- und Semidünnschnittserien) wurden mit einem Polyvar-Mikroskop (Reichert-Jung, Wien) analysiert und im Anschluss mit einer auf das Mikroskop montierten SPOT Digitalkamera (Diagnostic Instruments, Inc.) dokumentiert. Alle Bilder wurden mit Adobe Photoshop Software (Version 6.0 und 7.0, Adobe Systems, Inc.) bearbeitet.

Die Analyse und Dokumentation der elektronenmikroskopischen Präparate erfolgte an einem Hitachi-500 Transmissionselektronenmikroskop (Hitachi, Inc.). Von den Negativplatten aus wurde die Bildinformation über einen Scanner (Epson Perfection 3200 Photo, Epson, Inc.) digitalisiert und mit Adobe Photoshop Software (Version 6.0 und 7.0, Adobe Systems, Inc.) bearbeitet.

¹³ Die möglichst flache aber nicht gepresste Lage der Schnitte ist für die weitere Verarbeitung der Präparate unbedingt erforderlich.

¹⁴ Enthielten verschiedene Areale des SCN.

¹⁵ Ein Kompromiss zwischen unkontrastierten und doppelt kontrastierten Ultradünnschnitten sollte mit einer Behandlung mit 10% Uranylazetat ohne Bleizitrat erzielt werden. Um den Einfluss der Kontrastierungsverfahren mit Uranylazetat, bzw. der mit Uranylazetat und Bleizitrat sichtbar zu machen, wurden in den Schnittserien der Testpräparate benachbarte Schnitte nicht, einfach- oder doppelt kontrastiert. Hierbei erwiesen sich jedoch sowohl die Erkennbarkeit feiner Immunfärbungen, als auch die Identifizierung ultrastruktureller Details als unzureichend [siehe auch Abb.40C-D, Abb.43C-D und Abb.56A].

III. LICHTMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE

III.1 Die immunhistologisch bearbeiteten Hirnareale im Überblick

Zur leichteren räumlichen Zuordnung der immunhistologisch untersuchten Gebiete und ihrer möglichen Verbindungen dienen die schematische Übersicht [Abb. 9] und die darauf folgenden Methylenblau-Darstellungen der verschiedenen Hirnareale [Abb.10-12].

Um mögliche ANG II-haltige Verbindungswege des *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) [Abb.12C, siehe auch Abb.7] zu anderen Kerngebieten in seinem Umfeld zu identifizieren, wurden parallel zur lichtmikroskopischen Lokalisation von AT₁-Rezeptor-Immunreaktivität (AT₁-IR) im SCN auch benachbarte Areale auf AT₁-Rezeptoren hin untersucht. Dabei lag das Interesse auf jenen Kerngebieten, die in räumlicher Nähe zum SCN liegen und laut Literaturbefunden neuronale Verbindungen zum SCN unterhalten bzw. gemeinsame Funktionen ausüben (z.B. Ausschüttung von Vasopressin) [Abb.9].

Zu den ausgewählten Untersuchungsgebieten zählt die anteroventrale Region des 3.Ventrikels (AV3V), die retrochiasmatische Region (RCh) [Abb.11D], der *Nucleus paraventricularis* (PVN) [Abb.12A] und der *Nucleus supraopticus* (SON) [Abb.12B] des Hypothalamus. In der AV3V galt das Interesse dem *Organum vasculosum lamina terminalis* (OvLT) [Abb.10A-B], dem *Organum subfornicale*¹⁶ (SFO) [Abb.10C-F] sowie dem *Nucleus medianus* der präoptischen Region (MnPO) [Abb.11A]. Da OvLT und SFO über keine funktionelle Blut/Hirn-Schranke verfügen, wurde bei ihnen, wie auch beim SCN, ein Vergleich der AT₁-IR zwischen normotensiven SDR und transgen-hypertensiven TGR durchgeführt.

Aufgrund seiner möglichen Bedeutung als Quelle eines weiteren RAS sowie der besonderen Beschaffenheit seines Kapillarsystems, wurde der *Plexus choroideus*¹⁷ (ChP) [Abb.11B] neben dem Ependym der lateralen Ventrikel [Abb.11C] als Referenzfärbung zur AT₁-IR in AV3V und Hypothalamus herangezogen.

Dem PVN, SON und SCN ist eine Vasopressinausschüttung gemeinsam, deswegen wurden die drei im Hypothalamus liegenden Kerne auf ihre Vasopressin- und AT₁-IR bei normotensiven SDR untersucht.

Neben den Immunfärbungen an Paraffinpräparaten, wurden sowohl die AT₁-IR als auch ANG I/II-IR im SCN von normotensiven SDR an Kunstharzpräparaten überprüft [siehe Kap. III.7].

¹⁶ Nach der Nomina Anatomica, International Anatomical Nomenclature Committee, Fifth Edition, Williams & Williams Co., Baltimore, Maryland, 1983.

¹⁷ Nach den international vereinbarten *Nomina anatomica*, *Nomina histologica* und *Nomina embryologica* in der Fassung von 1989 (6.Auflage).

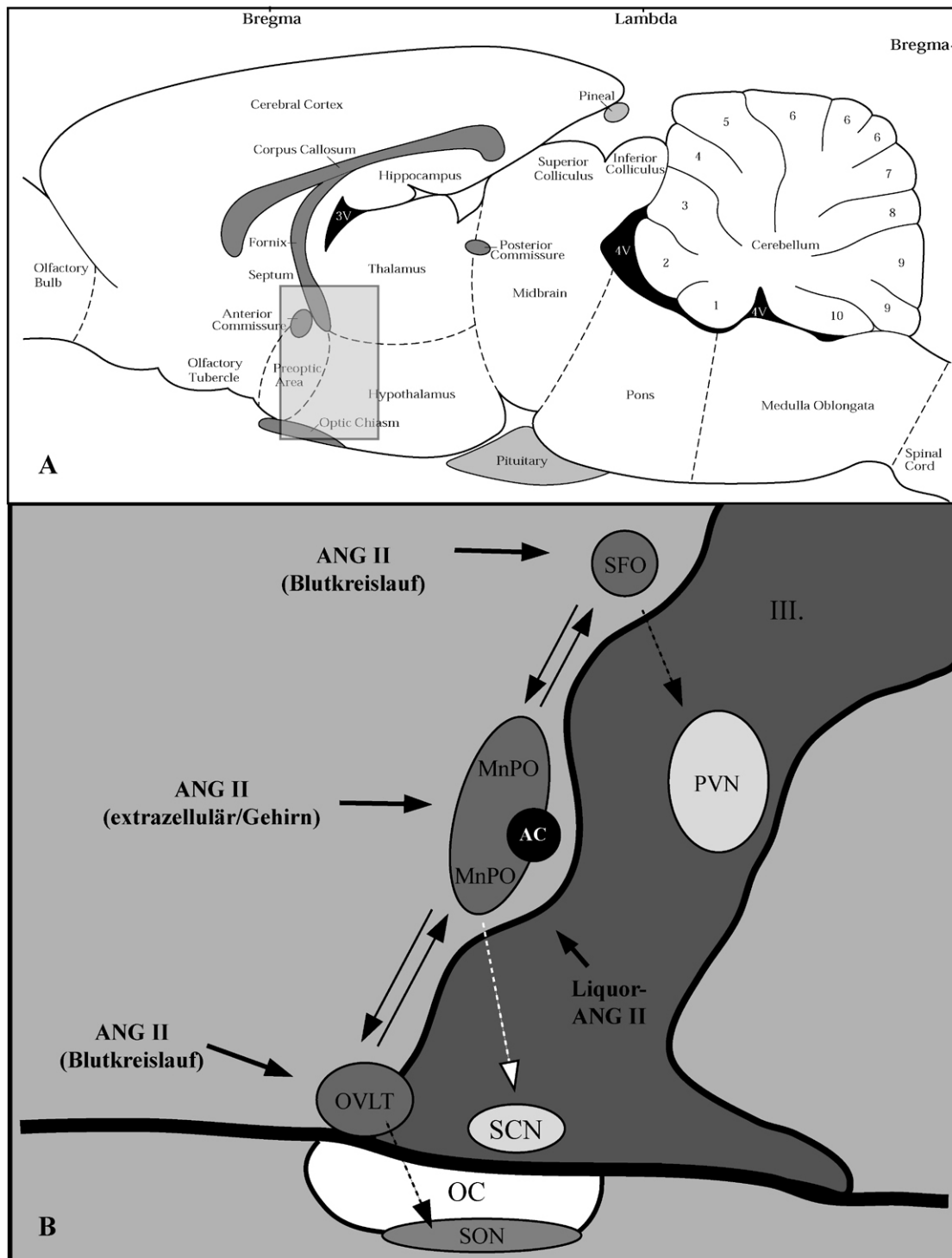


Abb.9: ANG II-haltige Kommunikationswege zwischen Hypothalamus und der AV3V.

(A) Schematische Darstellung eines Sagittalschnittes 0,4 mm lateral der Mittellinie. Das graue Kästchen in (A) zeigt die ungefähre Lage des immunhistochemisch untersuchten Gehirnbereichs. (B) Schematisierte Darstellung der immunhistologisch untersuchten Kerngebiete und ihre möglichen Verbindungen. Die Zirkumventrikularorgane OvLT und SFO sind sensitiv für zirkulierendes ANG II aus dem Blutkreislauf, welches sie über ihr Blutgefäßsystem aufnehmen. Sie unterhalten ANG II-haltige reziproke Verbindungen zum MnPO, der für Gehirn-ANG II, welches ihn über den Extrazellularraum erreicht sensitiv ist. Außerdem gelangt Liquor-ANG II über die 'ependymale Naht' der anterioren Wand des 3.Ventrikels in den MnPO. Das SFO und das OvLT sollen über ANG II-haltige Fasern mit Vasopressin-immunreaktiven Neuronen im PVN und im SON verbunden sein. Der MnPO unterhält direkte oder indirekte ANG II-haltige Verbindungen zum SCN, deren Natur noch Gegenstand der Forschung ist. Abkürzungen: MnPO, Nucleus medianus; OC, Chiasma opticum; OvLT, Organum vasculosum lamina terminalis; PVN, Nucleus paraventricularis; SCN, Nucleus supraquiasmaticus; SON, Nucleus supraopticus; SFO, Organum subfornicale; III., 3.Ventrikel. Abbildung (A) verändert nach G. Paxinos & C. Watson, The Rat Brain, Academic Press, 1997. Abbildung (B) erweitert nach H. Kobayashi & Y. Takei, 1996 [52].

Abb.10: Zwei Zirkumventrikularorgane in der AV3V.

(A-B) Methylenblaufärbungen zeigen coronale Schnitte durch den anterioren (A) und den caudalen Teil (B) des OvLT. Das OvLT besteht aus einem zentralen und zwei lateralen Anteilen. Anterior liegen alle Abschnitte auf dem Dach der Spitze des 3.Ventrikels (gestrichelte Linien in A). Caudalwärts ziehen Ausläufer der lateralen Teile entlang des Ependyms des 3.Ventrikels nach ventral (gestrichelte Linien in B). Das OvLT wird anterior von einem dichten Kapillarnetz durchzogen. Im zentralen Teil des OvLT ist ein Kanal mit dichtgepackten Gefäßen unterschiedlicher Größe ausgebildet.

(C-F) Methylenblaufärbungen zeigen coronale Schnitte durch die rostrale (C), die Übergangs- (D), die zentrale (E) und die caudale Region (F) des SFO. Die drei letzten Region können aufgrund ihrer morphologischen Organisation nochmals in eine dorsolaterale und eine ventromediale Zone unterteilt werden (gestrichelter Halbkreis in (D-F)). Übergangs-, Zentral- und Caudalregion werden von zahlreichen Kapillaren durchzogen. Im zentralen und besonders im caudalen Abschnitt des SFO ist ein zentral liegender Gefäßkanal ausgebildet. Das SFO liegt unterhalb des ventralen Abschnittes der *Commissura hippocampi* und wird lateral von großen Blutgefäßen flankiert. Abkürzungen: wie zuvor; CAP, Gefäßlumen; DL, dorsolaterale Zone; GK, Gefäßkanal; la, laterale Anteile des OvLT; ML, Mittellinie; vhC, ventraler Teil der *Commissura hippocampi*; VM, ventromediale Zone; ze, Zentraler Teil des OvLT. Balken entsprechen 100 µm.

>

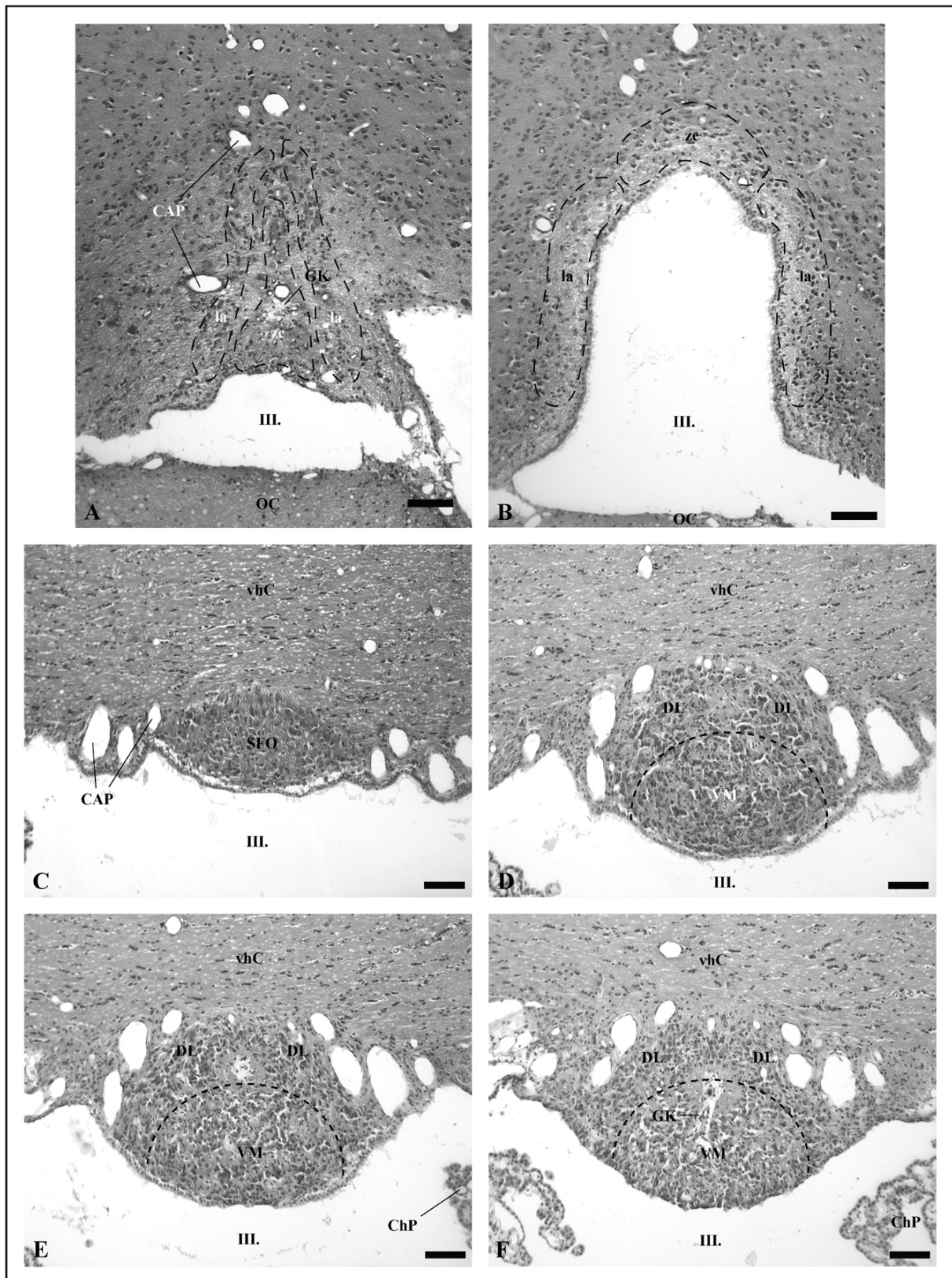


Abb. 10:

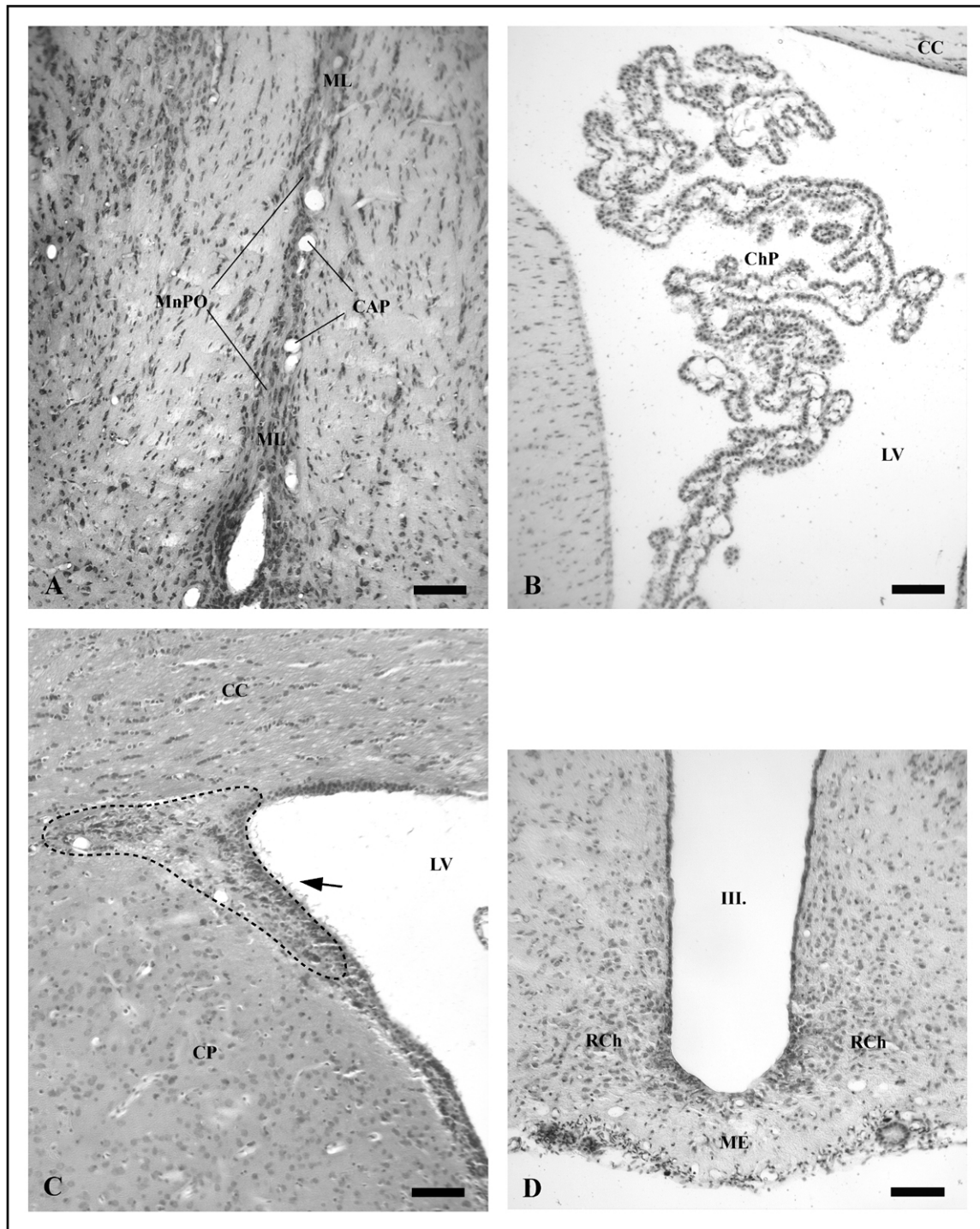


Abb.11: Der MnPO, der *Plexus choroideus*, das Ependym der lateralen Ventrikel und die *Eminentia mediana*.

(A) Eine Methylenblaufärbung zeigt den dorsalen Teil des MnPO. Er liegt dorsal der *Commissura anterior* und stellt ein unpaares Kerngebiet dar, welches entlang der Mittellinie der vorderen Ventrikelwand verläuft. Der MnPO wird von zahlreichen Blutgefäßen durchzogen. (B) Eine Methylenblaufärbung zeigt den dorsalen Teil des *Plexus choroideus* im lateralen Ventrikel. Die gefäßreiche Einstülpung der *Pia mater* dringt bis tief in den lateralen Ventrikel vor. (C) Eine Methylenblaufärbung demonstriert einen Ausschnitt der dorsolateralen Wand des lateralen Ventrikels. Der Ventrikel läuft an dieser Stelle kegelförmig nach lateral, sodass das Ependym teilweise quer getroffen ist (schwarzer Pfeil in B). In seiner Flucht liegt ein spitzes „Horn“ aus zell- und gefäßreichem Gewebe, das sich zwischen das dorsale *Caudatum putanem* und den *Corpus callosum* schiebt (gestrichelte Linie in B). (D) Eine Methylenblaufärbung zeigt den ventralen Teil des 3.Ventrikels auf Höhe der retrochiasmatischen Region. Eine aufgewölbte brückenähnliche Struktur, die *Eminentia Mediana* schließt sich dem anterior gelegenen *Chiasma opticum* an und stellt hier den dünnen Boden des 3.Ventrikels. Sie zieht als faserreiches Gebilde zur Hypophyse. Abkürzungen: wie zuvor; AC, *Commissura anterior*; CP, *Caudatum putanem*; CC, *Corpus callosum*; LV, lateraler Ventrikel; ME, *Eminentia mediana*; ChP, *Plexus choroideus*; RCh, retrochiasmatische Region. Balken entsprechen 100 µm.

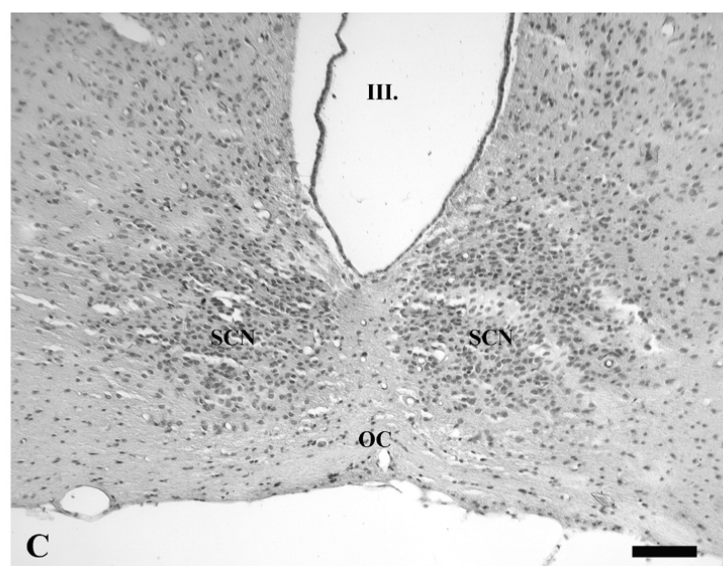
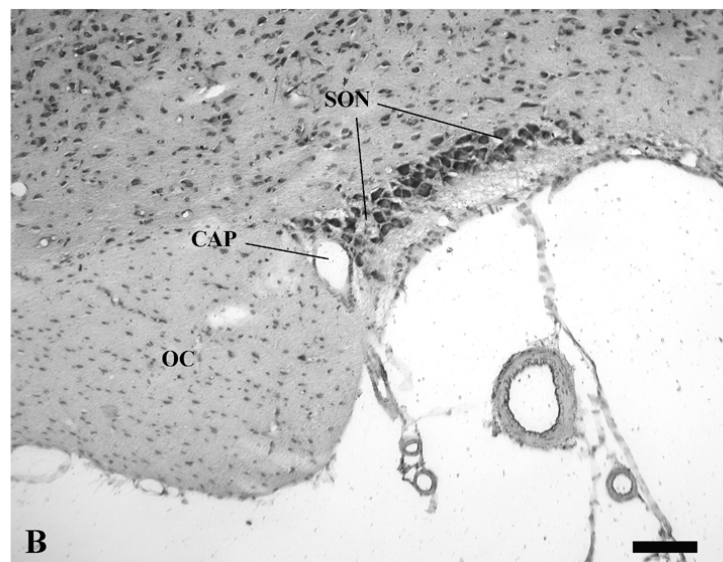
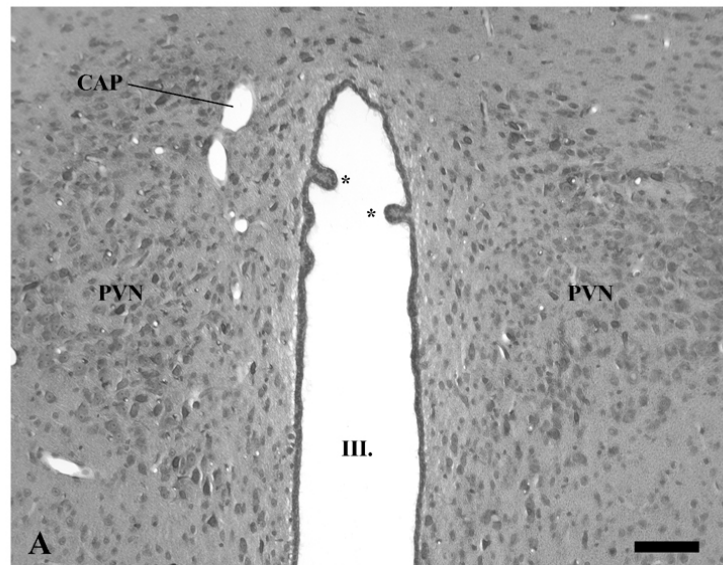


Abb.12: *Nucleus paraventricularis*, *Nucleus supraopticus* und *Nucleus supra-chiasmaticus*, drei untersuchte Kerngebiete im Hypothalamus.

Methylenblaufärbungen zeigen drei Regionen im Hypothalamus, die für die immunhistologischen Untersuchungen zur Vasopressin- und AT_1 -Rezeptor-Immunreaktivität von besonderem Interesse sind. (A) Die Aufnahme zeigt den zentralen Teil des *Nucleus paraventricularis*, der hier als PVN bezeichnet wird. Er ist zu beiden Seiten des dorsolateralen Randes des 3.Ventrikels (ventraler Teil) lokalisiert. Seine Position lässt sich leicht anhand der bilateral symmetrisch angelegten Einfaltungen des Ependyms ermittelt (*). In seinem zentralen Teil liegen große Neurone in engem Kontakt zu Blutgefäßen unterschiedlicher Größe. (B) Der *Nucleus supraopticus* (SON) ist lateral des *Chiasma opticum* positioniert. Zahlreiche Gefäße unterschiedlicher Größe durchziehen ein Netz großer Neurone. (C) Die Abbildung zeigt die zwei bilateral symmetrisch angelegten Teile des *Nucleus supra-chiasmaticus* (SCN) oberhalb des *Chiasma opticum*. Die Kerngebiete liegen lateral des ventralen Randes des 3.Ventrikels und werden von einem faserhaltigen Ausläufer des *Chiasma opticum* voneinander getrennt. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 100 μ m.

III.2 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie in der AV3V und der präoptischen Region von SDR und TGR

Das OvLT und das SFO gehören zu einer Reihe von Kerngebieten, die in unmittelbarer Nähe des 3.Ventrikels lokalisiert sind und auch als Zirkumventrikularorgane bezeichnet werden. Besonders dem OvLT und dem SFO wird aufgrund der fehlenden Blut/Hirn-Schranke eine hohe ANG II-Sensitivität zugesprochen. Über neuronale Fasern des MnPO sind OvLT und SFO miteinander verbunden [Abb.9].

III.2.1 AT₁-Rezeptoren im *Organum vasculosum lamina terminalis*

III. 2.1.1 Im Parenchym des OVLT von SDR

Das OvLT ist auf dem Dach und teilweise lateral der Spitze des 3.Ventrikels lokalisiert [Abb.10A-B]. Die AT₁-Immunreaktivität (AT₁-IR) demonstriert eine Aufteilung des OvLT in eine zentrale und zwei laterale Regionen, die jeweils von einigen größeren (20-60 µm) und zahlreichen kleineren (5-20 µm) Blutgefäßen durchzogen sind [Abb.13, Teil 1-2A-F]. Kleine lichtmikroskopische Vergrößerung zeigt, ein flächendeckendes Immunsignal in allen Anteilen des OvLT - mit Ausnahme einer zentralen Gefäßregion [Abb.13, Teil 1-2A-F]. Lateral und dorsal wird das OvLT von größeren Gefäßen (20-40 µm) begleitet. Die Blutgefäße in der äußeren Peripherie des OvLT weisen inhomogene Immunreaktionen gegen den AT₁-Antikörper auf. Teils sind ihre perivaskulären Regionen frei von Immunsignalen, teils zeigen sich wenig bis starke Immunreaktionen [Abb.13, Teil 1-3A-F].

Anterior liegen alle immunreaktiven Regionen des OvLT kuppelartig über der Ventrikelspitze [Abb.13, Teil 1-2A-C]. Hier wird das OvLT von einem schmalen Netz aus dicht gepackten Blutgefäßen unterschiedlichster Größe durchzogen. Die zentrale Gefäßregion (Gefäßkanal) ist über weite Strecken kaum immunreaktiv und verläuft in der Flucht der Mittellinie vom Dach des 3.Ventrikels zum dorsalen Rand des anterioren OvLT. Ventral und lateral wird der Gefäßkanal vom zentralen bzw. den beiden lateralen Anteilen des OvLT umgeben [Abb.13, Teil 1-2A-C].

Abb.13, Teil 1-2: ANG II-Bindungsstellen im OvLT normotensiver SDR.

Die Abbildungen (13, Teil 1-2) zeigen Serien von je 6 ca. 10 µm dicken Schnitten durch das OvLT zweier SDR. Die Schnittebenen liegen ca. 80 µm voneinander entfernt. Anterior ist das OvLT kuppelartig über dem Dach des 3.Ventrikels positioniert. Es unterteilt sich in einen zentralen (ze) und zwei laterale (la) Bereiche, die bei SDR alle eine starke und dichte Immunreaktivität aufweisen (* in Teil 1-2B). Der anteriore Teil des OvLT ist zentral auf der dorsoventralen Achse von einem Gefäßkanal durchzogen (GK in Teil 1-2A und C). Caudalwärts verliert das OvLT an Höhe, wobei Ausläufer der lateralen Teile am 3.Ventrikel nach ventral absteigen. Die AT₁-IR ist in diesen Bereichen bei SDR stark ausgeprägt (* in Teil 1-2D). Zu seinem posterioren Ende hin verringert sich die immunreaktive Zone des zentralen Bereichs sowie der lateralen Ausläufer zu einem schmalen Streifen der bis maximal 100 µm in die dorsale bzw. laterale periventrikuläre Region reicht (* in Teil 1-2F). Das Ependym des 3.Ventrikels zeigt im Bereich des OvLT ebenfalls eine starke, aber nicht kontinuierliche Immunreaktivität (offene Pfeilspitzen in Teil 1-2B und D). Zum posterioren Ende hin lassen sich selbst bei geringer lichtmikroskopischer Vergrößerung immunreaktive Fasern - vermutlich Tanyzytenfortsätze - in Ventrikelnähe identifizieren (offene Pfeile in Teil 1-2F). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 100 µm. >>

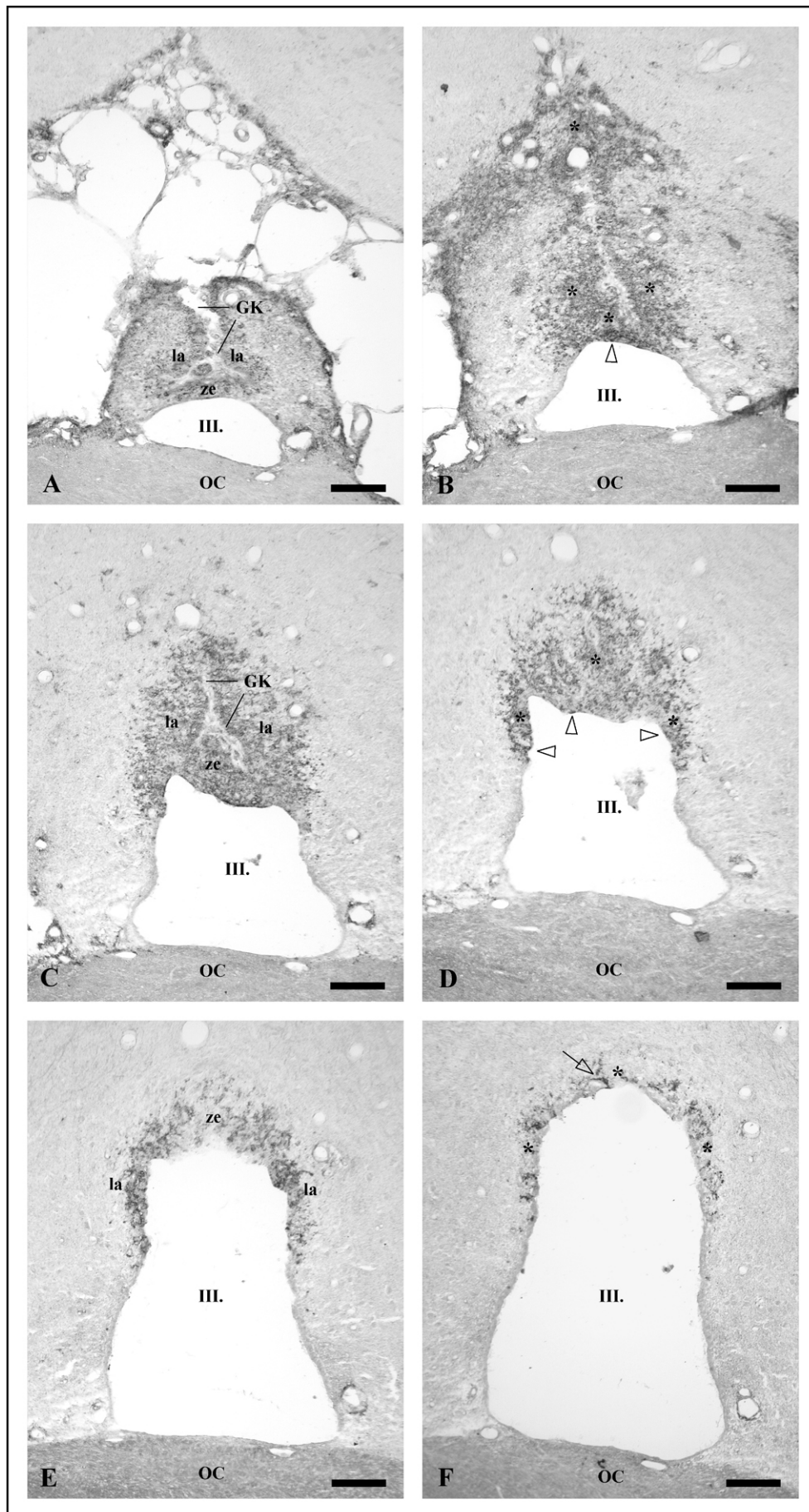


Abb.13 Teil 1:

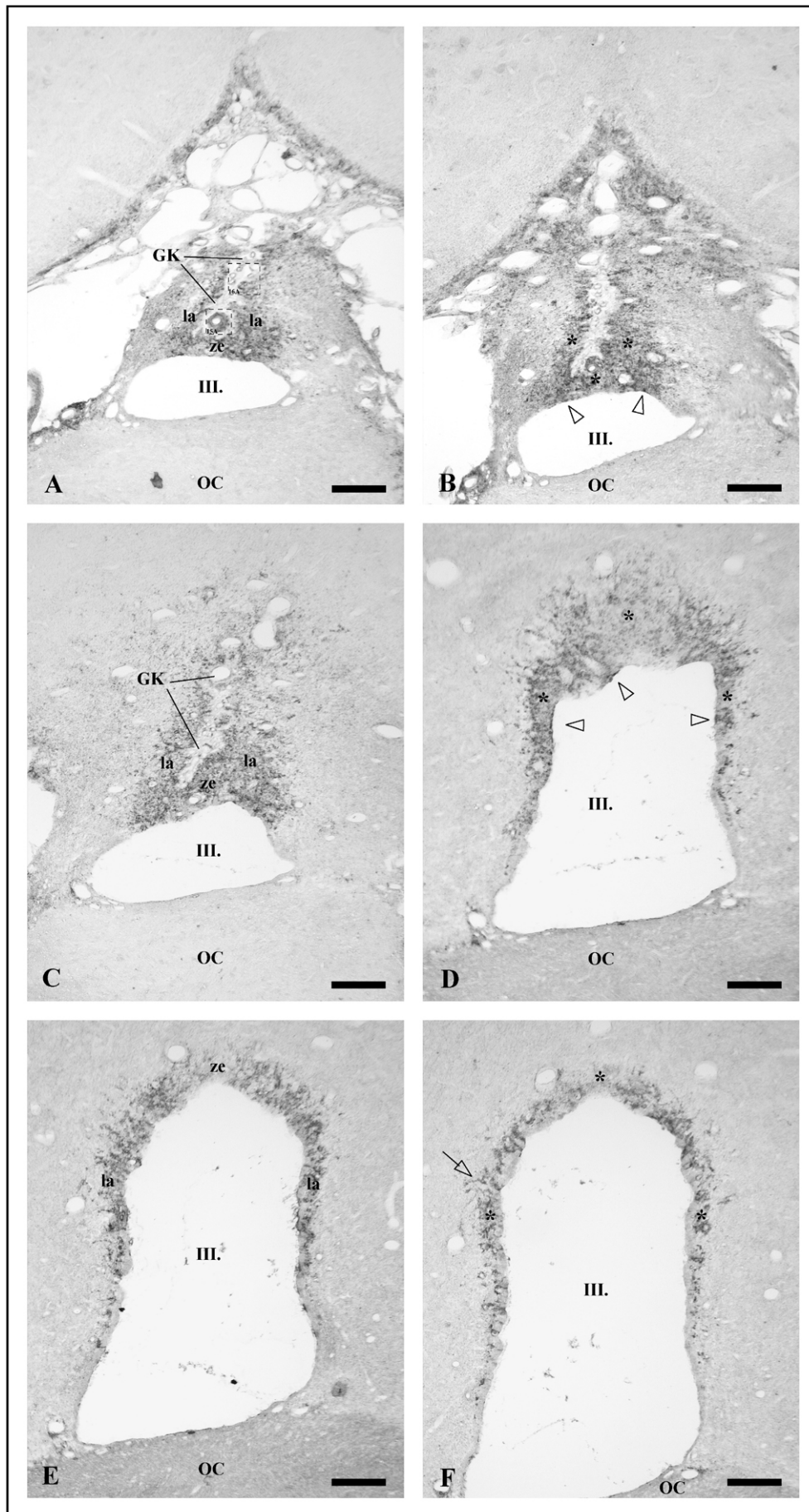


Abb.13 Teil 2:

Caudalwärts werden die zentralen und lateralen Anteile zunehmend flacher. Schmale immunreaktive Ausläufer des lateralen OvLT steigen am 3.Ventrikel herab und flankieren den sich aufweitenden 3.Ventrikel nun auch lateral [Abb.13, Teil 1-2D-F]. Die zentrale Gefäßregion ist vom deutlich immunreaktiven Gewebe des zentralen OvLT abgelöst [Abb.13, Teil 1-2D]. Weiter nach caudal gewinnt der 3.Ventrikel an Höhe, während die immunreaktiven Regionen des OvLT samt seiner lateralen Ausläufern deutlich schmaler werden [Abb.13, Teil 1-2E-F]. Hierbei nimmt die Immunreaktion nach caudal und zu den Rändern hin in ihrer Dichte ab, ist aber lokal immer noch sehr kräftig [Abb.13, Teil 1-2D-F]. So zeigt das Ependym entlang der oberen 2/3 des Ventrikels punktuelle Markierungen, von denen teils kräftig immunreaktive Fasern - vermutlich Tanyzytenfortsätze - ausgehen und in die periventrikuläre Region hinein ragen [Abb.13, Teil 1-2F].

Höher vergrößerte Lichtmikroskopie zeigt, dass die zentrale Gefäßregion des OvLT in wenig dichtem, kaum immunreaktivem Gewebe eingebettet ist. In einiger Entfernung werden die Gefäße jedoch von hoch reaktivem, dichtem Parenchym flankiert [Abb.14A-B]. Vermutlich stellte es ursprünglich die perivaskulären Regionen der zentralen Gefäße dar und wurde durch Zug- und Scherkräfte teilweise von den Gefäßen abgerissen [Abb.14A-B]. Im dichten Parenchym finden sich zahlreiche mit dem DAB-Reaktionsprodukt markierte Zellen [Abb.14A-B]. Der Grossteil davon liegt kranzförmig entlang der Gefäßregion. Darüber hinaus weist das Parenchym hier unzählige kleine punktuelle DAB-Markierungen, die auf eine Immunreaktivität in und an Terminalen, Dendriten und Gliaelementen schließen lässt [Abb.14A-B].

Im ventralen Bereich des zentralen OvLT lassen sich ebenfalls AT₁-immunreaktive Zellen lokalisieren. Sie liegen entweder im Ependym [Abb.14A] oder direkt darunter [Abb.14B]. Immunreaktive Zellfortsätze, welche zu den subependymalen und ependymalen Zellen - vermutlich Tanyzyten - gehören, sind hier jedoch nicht einwandfrei zu erkennen [Abb.14A-B].

III.2.1.2 Im Parenchym des OvLT von TGR

Unter Berücksichtigung der individuellen Unterschiede entspricht die Verteilung und Dichte der AT₁-IR im OvLT von transgen-hypertensiven TGR in weiten Teilen der von normotensiven SDR. Zumindest weisen sowohl die zentrale Region, wie auch die beiden lateralen Regionen samt ihrer Ausläufer ausgeprägte Immunreaktivität auf [Abb.13, Teil 3A-F]. Die immunreaktiven Anteile des OvLT liegen kuppelartig über dem 3.Ventrikel [Abb.13, Teil 3A-C]. Caudalwärts wird das OvLT auf seiner dorsolateralen Achse schmaler und entsendet immunreaktive Ausläufer am Ependym nach ventral [Abb.13, Teil 3D-F].

In den lateralen Ausläufern lassen sich, wie bei SDR auch, einzelne immunreaktive Fasern lokalisieren [Abb.13F]. Allerdings erscheint die immunreaktive mittlere Sektion des OvLT der TGR nach lateral verbreitert [Abb.13, Teil 3D].

Im Allgemeinen sind die 3.Ventrikel der sechs TGR in ihren Volumina und besonders in ihrer Breite vergrößert [Abb.13, Teil 3A-F]. Die größeren Blutgefäße in der Peripherie des OvLT erscheinen bei den transgen-hypertensiven Versuchstieren ebenfalls vergrößert, weisen aber bei niedriger lichtmikroskopischer Vergrößerung keine von SDR abweichenden Veränderungen in ihren Immunsignalen auf, d.h. sie sind nicht bis kräftig markiert.

Besonders auffällig ist die Verbreiterung der zentralen Gefäßregion der TGR [Abb.13 Teil 3A-C]. Hier zeigen sich besonders deutlich die durch Zug- und Scherkräfte verursachten Gewebeschäden, welche die zentralen Gefäße von ihren perivaskulären Regionen trennen [Abb.14C]. Die Immunreaktivität im Parenchym, welches die zentrale Gefäßregion umgibt ist wie bei den SDR über weite Flächen stark ausgeprägt. Das Immunsignal ist hier, ähnlich wie bei SDR, in und an wenigen größeren Zellen und vielen kleinen Zellen lokalisiert [Abb.14C-D]. Darüber hinaus weist das Parenchym massiv punktuelle DAB-Niederschläge auf, die auf Immunreaktionen an Terminalen, Dendriten und Gliaelementen hindeuten [Abb.14.C-D].

Abb.13, Teil 3: ANG II-Bindungsstellen im OvLT von transgen-hypertensiver TGR.

Die Abbildung zeigt eine Serie von 6 ca. 10 µm dicken Schnitten durch das OvLT einer TGR. Die Schnittebenen liegen ca. 80 µm voneinander entfernt. Anterior ist das OvLT kuppelartig über dem Dach des 3.Ventrikels positioniert. Es unterteilt sich in einen zentralen (ze) und zwei laterale (la) Bereiche, die bei TGR alle eine starke und dichte Immunreaktivität aufweisen (* in B). Der anteriore Teil des OvLT ist zentral auf der dorsoventralen Achse von einem Gefäßkanal durchzogen, der bei TGR nach lateral ausgedehnt erscheint (GK in A und C). Caudalwärts verliert das OvLT an Höhe, wobei Ausläufer der lateralen Teile am 3.Ventrikel nach ventral absteigen. Die AT₁-IR ist in diesen Bereichen bei TGR ebenfalls stark ausgeprägt (* in D). Zu seinem posterioren Ende hin verringert sich die immunreaktive Zone des zentralen Bereichs sowie der lateralen Ausläufer zu einem schmalen Streifen der bis maximal 100 µm in die dorsale bzw. laterale periventriculäre Region reicht (* in F). Das Ependym des 3.Ventrikels zeigt im Bereich des OvLT ebenfalls eine starke, aber nicht kontinuierliche Immunreaktivität (offene Pfeilspitzen in B und D). Zum posterioren Ende hin lassen sich selbst bei geringer lichtmikroskopischer Vergrößerung immunreaktive Fasern - vermutlich Tanyzytenfortsätze - in Ventrikelnähe identifizieren (offene Pfeile in F). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 100 µm. >

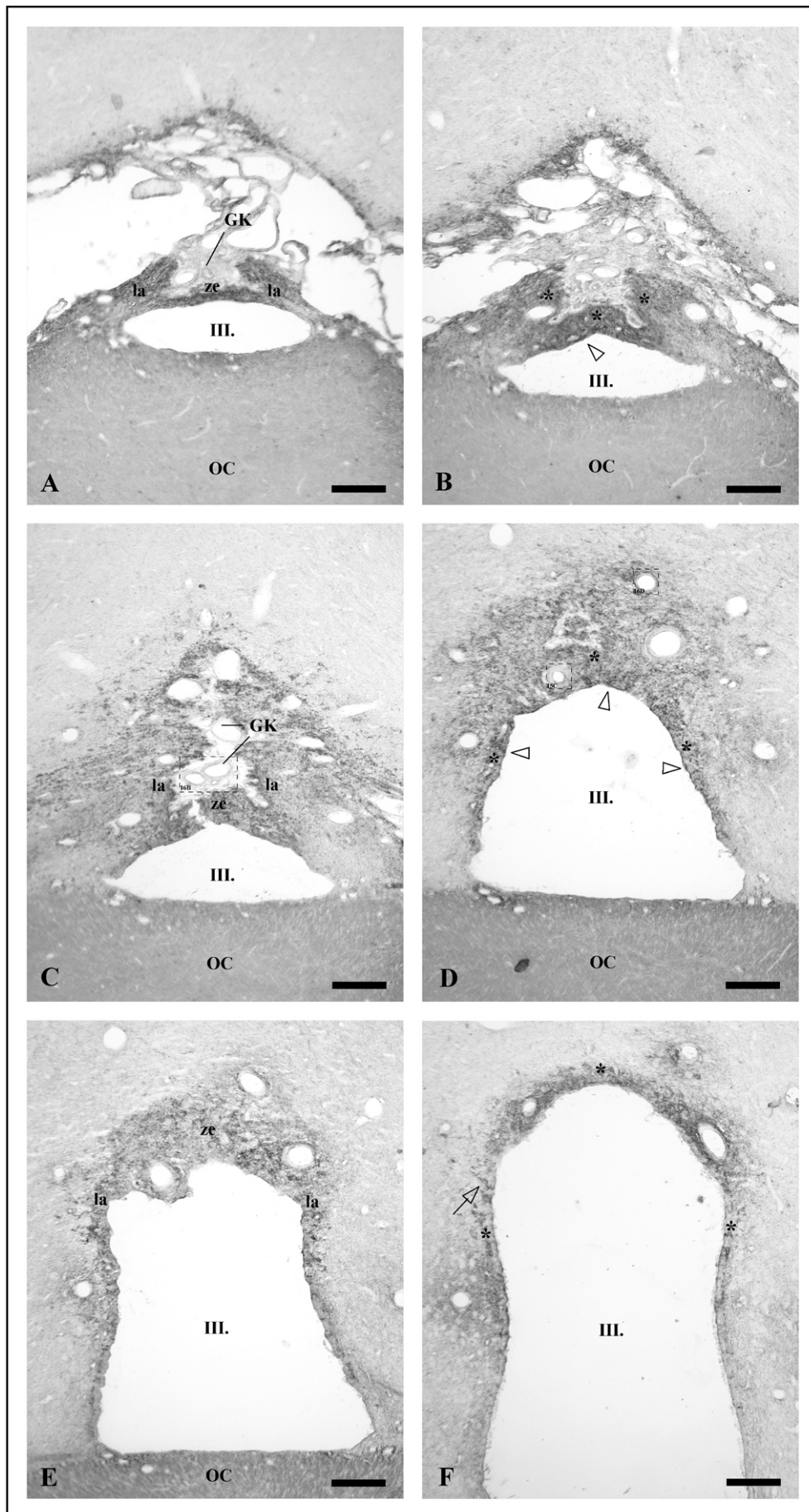


Abb.13 Teil 3:

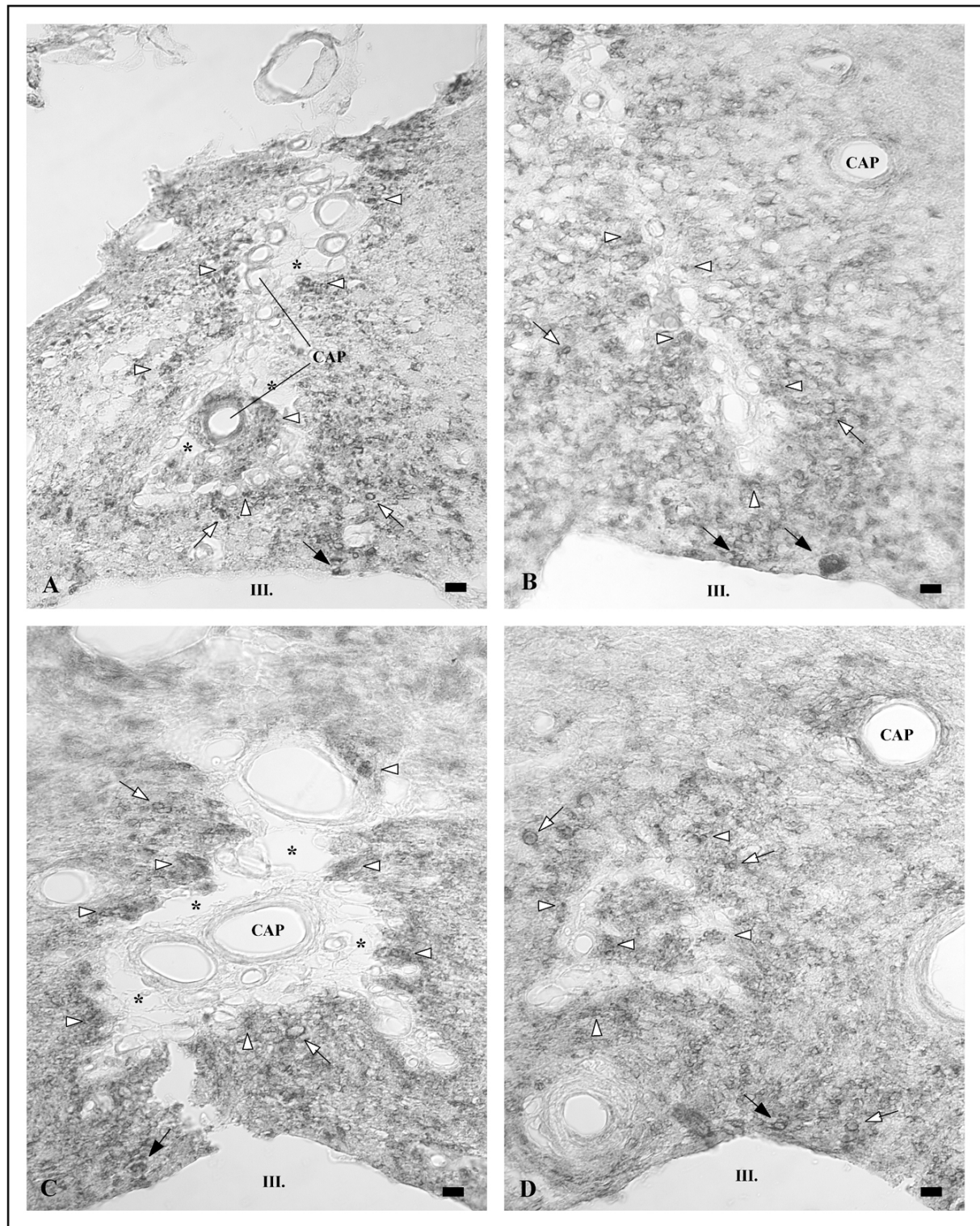


Abb.14: ANG II-Bindungsstellen im zentralen OvLT von SDR und TGR.

Höher vergrößerte Lichtmikroskopie zeigt die zentrale Gefäßregion des OvLT von SDR (A und B) und TGR (C und D). Ein Netzwerk von Blutgefäßen unterschiedlicher Größe durchzieht diesen zentralen Bereich. Starke und kontinuierliche AT_1 -IR zeigt sich in den perivaskulären Regionen dieser zentralen Gefäßregion (weiße Pfeilspitzen in A-D). Die Gefäße scheinen jedoch durch Zug- und Scherkräfte von ihrer Umgebung teilweise getrennt (* in A und C).

In den Zonen kräftiger AT_1 -IR sind zahlreiche Zellen unterschiedlicher Größe intrazellulär oder an ihren Zellmembranen durch das DAB-Reaktionsprodukt markiert (weiße Pfeile in A-D). Darüber hinaus sind bei SDR und TGR subependymale und ependymale Zellen durch DAB-Ablagerungen markiert - möglicherweise subependymale und ependymale Tanyzyten - (schwarze Pfeile in A-D).
Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 10 μ m.

III.2.1.3 In Blutgefäßen des OvLT von SDR

Die sichere Bestimmung der im OvLT zahlreich vorhandenen kleineren Gefäße (5-20 µm im Durchmesser) ist schwierig und besonders die Differenzierung in Kapillaren oder präkapilläre Arteriolen ist auf lichtmikroskopischer Ebene stark limitiert¹⁸. In wenigen Fällen sind Gefäße (8-20 µm im Durchmesser) zu identifizieren, deren perivaskuläre Regionen eine konzentrische mehrschichtige Struktur mit einer Stärke von bis zu 10 µm aufweisen [Abb. 15]. Bei ihnen könnte es sich um kleine Endarteriolen vom muskulären Typ handeln¹⁹.

Die meisten Blutgefäße - dieser Größenordnung - verfügen hier aber über keine erkennbar regelmäßigen (konzentrischen) perivaskulären Regionen, was auf ein Fehlen der glatten Muskulatur schließen lässt. Hierbei handelt es sich vermutlich um nichtmuskuläre Sektionen von Endarteriolen (präkapilläre Arteriolen) oder um größere Kapillaren [Abb.15].

Die muskulären Endarteriolen des OvLT, zeigen in ihrem Endothel deutliche, aber lokal begrenzte AT₁-IR [Abb.16, Teil 1A], während sie in ihren perivaskulären Regionen zahlreiche, kleine immunreaktive, periendotheliale und perivaskuläre Strukturen aufweisen. Darüber hinaus, zeigt das Gewebe dieser Regionen eine deutliche Hintergrundfärbung, die auf zahlreiche intrazelluläre DAB-Ablagerungen hindeutet [Abb.16, Teil 1B]²⁰.

Die Endothelien der nichtmuskulären, präkapillären Arteriolen und der Kapillaren aus der zentralen Gefäßregion sind deutlich bis schwach immunreaktiv, wobei die einzelnen Immunsignale immer auf kleine Areale des Endothels begrenzt sind [Abb.16, Teil 2A]. Die Endothelien etwas größerer Gefäße (ca. 20 µm) in der Peripherie des OvLT hingegen, weisen nur schwache AT₁-IR auf [Abb.16, Teil 2C]. In ihren perivaskulären Regionen zeigen die nichtmuskulären Gefäße der Zentralregion, wie auch der Peripherie eine starke AT₁-IR. Das DAB-Reaktionsprodukt markiert hierbei zahlreiche kleinere Strukturen, aber auch die Zellmembranen einzelner großer und kleiner Perikarya [Abb.16, Teil 2A und 2C].

¹⁸ Erschwert wird die Unterscheidung zwischen Kapillaren und Endarteriolen durch einen mehr oder weniger fließenden Übergang zwischen beiden Blutgefäßtypen und stark variierenden Größenangaben innerhalb der Literatur.

¹⁹ Denkbar wäre hierbei eine Übergangsregion zwischen Arteriolen und Kapillaren, die sog. Endäste der Arteriolen, deren glatte Muskulatur hier als präkapillärer Sphinkter dienen würde.

²⁰ Die perivaskulären Regionen dieser Gefäße sind bei SDR aufgrund ihrer intensiven DAB-Markierung lichtmikroskopisch nur schwierig zu bestimmen, zumindest ist die konzentrische Schichtung in der Region nicht sicher auszumachen. Alternativ zu ihrer Interpretation als Endarteriolen vom muskulären Typ, muß ein aufgeweiteter Perivaskularraum, wie er auf subzellulärer Ebene gezeigt werden konnte, in Betracht gezogen werden [92].

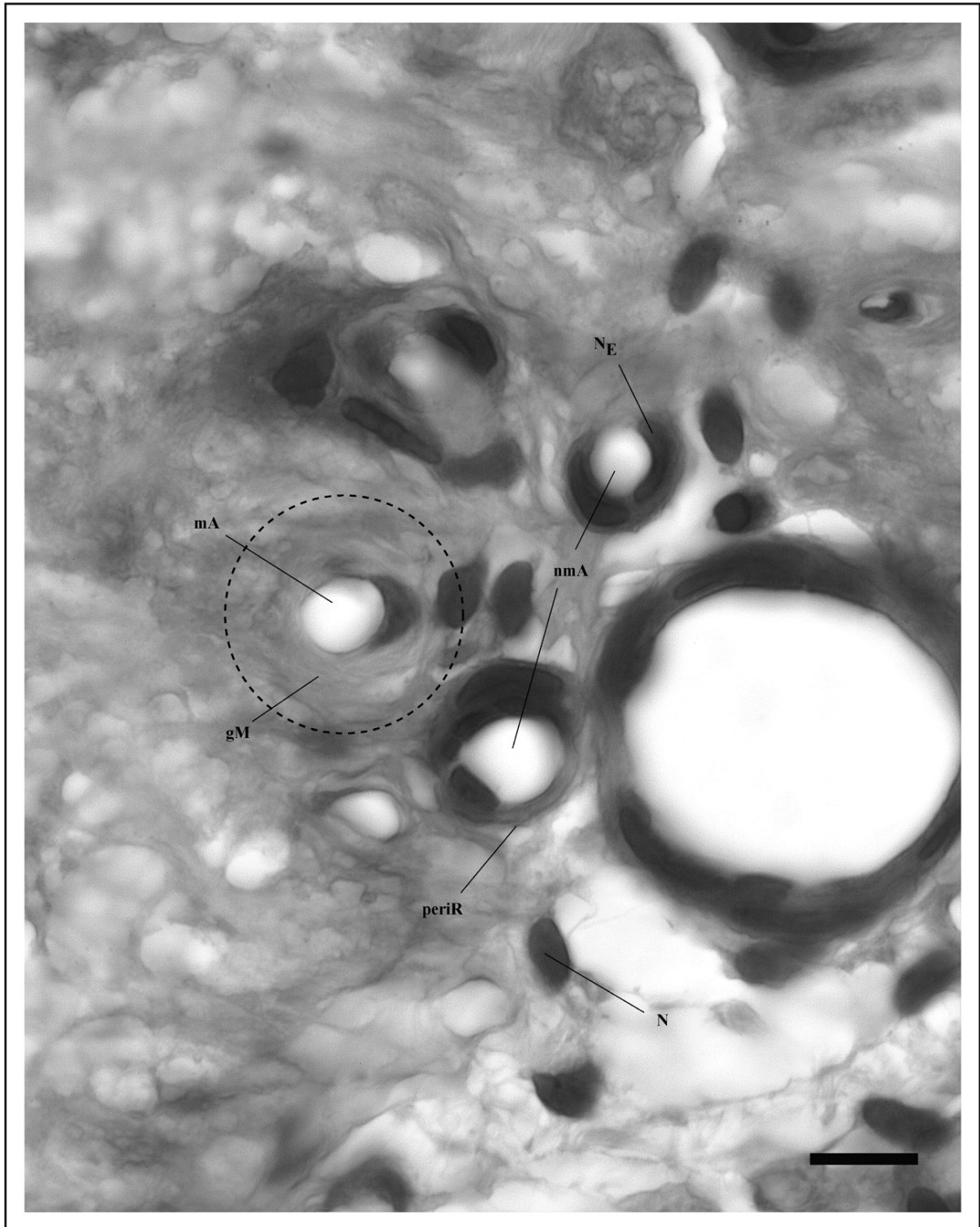


Abb.15: Muskuläre und nicht-muskuläre Gefäße im OvLT.

Photographie einer Methylenblaufärbung zeigt Querschnitte durch verschieden große Blutgefäße in der zentralen Gefäßregion des OvLT einer SDR. Ein kleines Gefäß (Lumen ca. 7 μm im Durchmesser) mit mehrschichtiger perivaskulärer Region (gestrichelter Kreis) ist zwischen anderen kleinen Blutgefäßen erkennbar. Die perivaskuläre Region des Arteriolenendastes umgibt das Gefäß ringförmig in mehreren Schichten auf einer Breite von ca. 5 μm und stellt vermutlich glatte Muskulatur dar. Andere Gefäße - von vergleichbarer Größe - zeigen keine ausgeprägte konzentrische Schichtung in ihrer Umgebung, bzw. weisen deutlich dünnere perivaskuläre Regionen auf. Abkürzungen: wie zuvor; gM, glatte Muskulatur; mA, muskuläre Arteriole; N, Zellkern; NE, Zellkern der Endothelzelle; nmA, nicht-muskuläre Arteriole oder Kapillare; periR, perivaskuläre Region. Balken entspricht 10 μm .

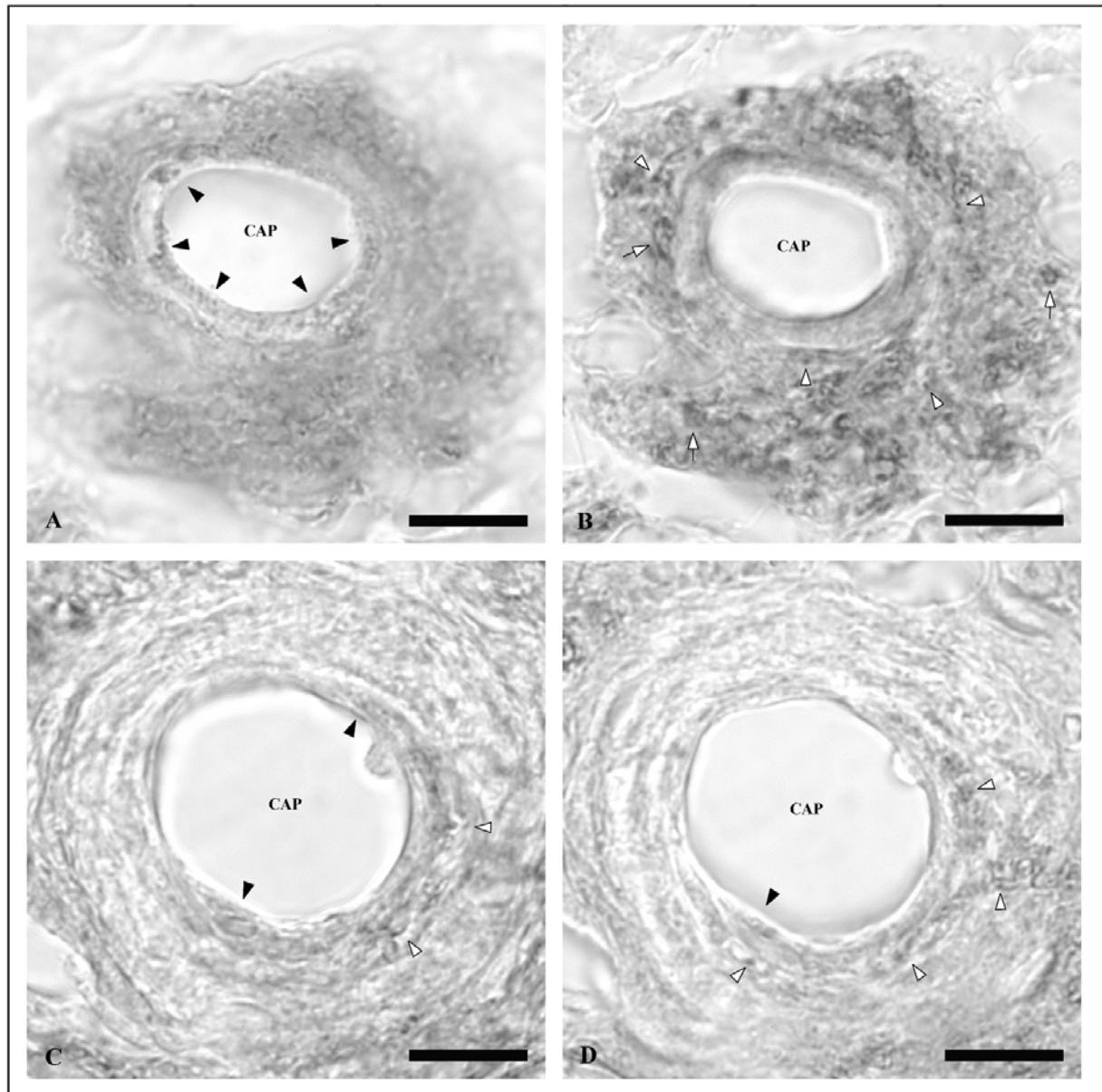


Abb.16, Teil 1: ANG II-Bindungsstellen im Endothel und der perivaskulären Region von muskulären Enderteriolen im OvLT von SDR und TGR.

(A-D) Ausschnittsvergrößerungen von Abbildung 13 Teil 2A und Teil 3D zeigen je eine Arteriole mit konzentrisch dichter perivaskulärer Region einer SDR (A und B) und einer TGR (C und D) in zwei Fokusebenen. (A) Das Endothel der Arteriole weist eindeutige ANG II-Bindungsstellen auf (schwarze Pfeilspitzen in A). (B) In der dicht gepackten ringförmig um das Gefäß angelegten perivaskulären Region der Arteriole sind zahlreiche kleinere Strukturen durch DAB-Reaktionsprodukte (weiße Pfeilspitzen in B) sowie wenige kleine Perikarya an ihren Zellmembranen markiert (weiße Pfeile in B). (C und D) ANG II-Bindungsstellen sind im Endothel der muskulären Arteriole nur in geringem Maß vorhanden (schwarze Pfeilspitzen in C und D). Die konzentrisch angelegte perivaskuläre Region weist deutlich weniger Immunreaktionen auf, als bei SDR (B) zu sehen sind (weiße Pfeilspitzen in D). Abkürzungen: wie zuvor; Balken entsprechen 10 μ m.

Abb.16, Teil 2: ANG II-Bindungsstellen im Endothel und der perivaskulären Region von Kapillaren und nicht-muskulären Arteriolen im OvLT von SDR und TGR.

(A und B) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen von Abbildung 13 Teil 2A und Teil 3C zeigt größere und kleinere Gefäße in der Zentralregion des OvLT von SDR (A) und TGR (B). (C und D) Ausschnittsvergrößerungen von Abbildung 13 Teil 1B und Teil 3D (90° gekippt gegen den Uhrzeiger) zeigen Kapillaren und Arteriolen vom nichtmuskulären Typ und einer SDR (C) und einer TGR (D). Verschieden große Blutgefäße in der Zentralregion des OvLT weisen bei SDR deutlich sichtbar AT₁-IR im Endothel auf (schwarze Pfeilspitzen in A). Im Gegensatz hierzu zeigen die Endothelien der TGR in dieser Region keine Immunreaktionen (B). In den perivaskulären Regionen dieser Gefäße lassen sich bei beiden Rattenstämmen allerdings deutliche Markierungen identifizieren (weiße Pfeilspitzen in A und B). In der äußeren perivaskulären Region, die durch das vermutlich durch Zug- und Scherkräfte auseinander gezogene grobmaschige Gewebe von den Gefäßen getrennt ist (* in A und B), sind intrazelluläre und Zellmembranständige AT₁-IR zu erkennen (weiße Pfeile in A und B). Nichtmuskuläre Arteriolen in der Peripherie des OvLT beider Rattenstämme zeigen in ihren Endothelien keine oder nur geringe Spuren von AT₁-IR (schwarze Pfeilspitze in C). In den inneren perivaskulären Regionen lassen sich jedoch deutliche DAB-Ablagerungen erkennen (weiße Pfeilspitzen in C und D), während in der äußeren Peripherie die Perikarya und Zellmembranen von kleineren und größeren Zellen durch DAB-Partikel kräftig markiert sind (weiße Pfeile in C und D). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 10 µm.

>

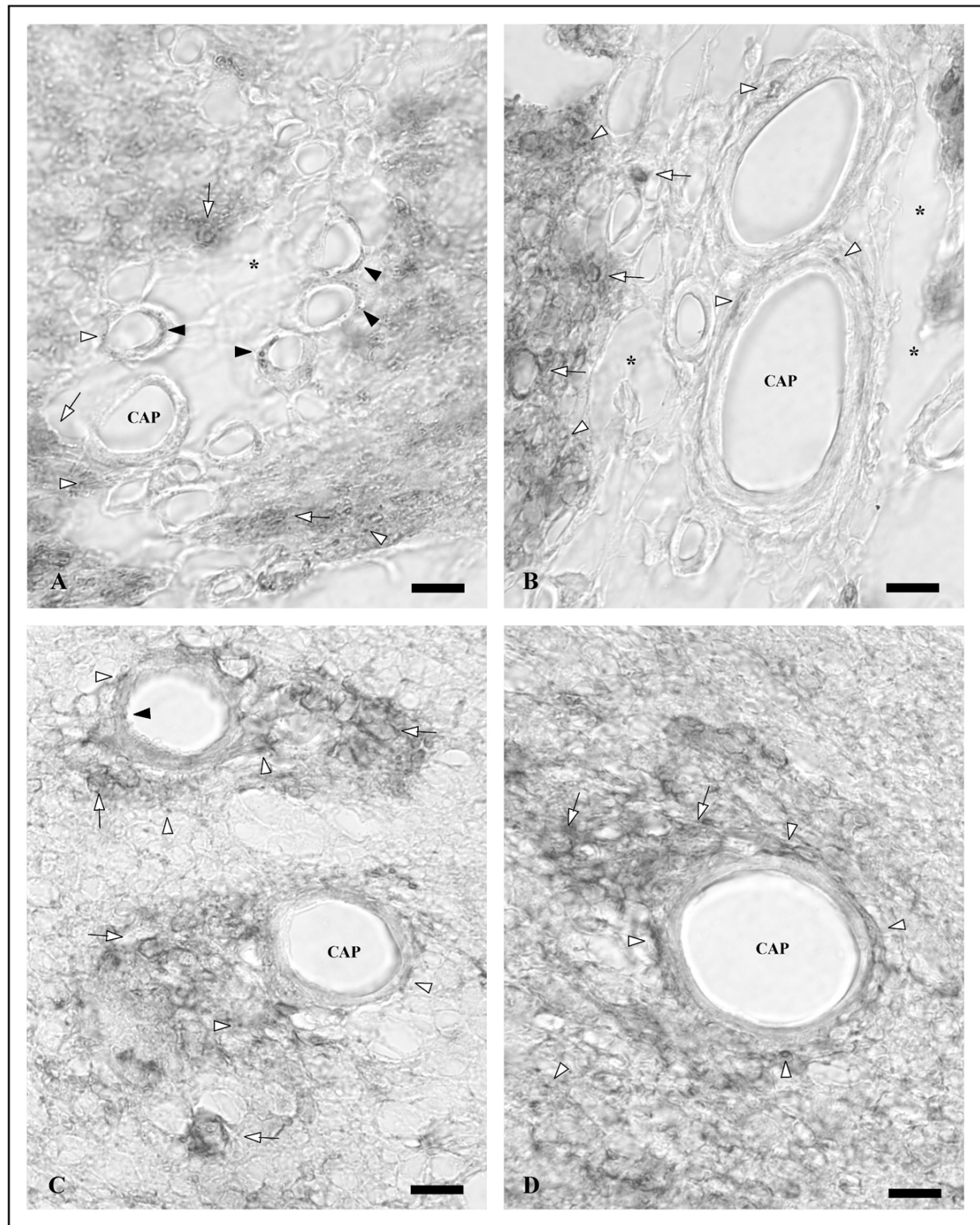


Abb.16 Teil 2:

III.2.1.4 In Blutgefäßen des OvLT von TGR

Höhere lichtmikroskopische Vergrößerung zeigt, dass die AT₁-IR im Endothel der muskulären Endäste der Arteriolen bei TGR schwächer ausfällt, als bei den normotensiven SDR. DAB-Ablagerungen sind vereinzelt und sehr lokal begrenzt im Endothel lokalisiert [Abb.16, Teil 1C]. Die perivaskulären Regionen der muskulären Gefäße der transgenhypertensiven TGR sind überwiegend frei von Immunsignalen²¹ [Abb.16, Teil 1D].

In den Endothelien von nichtmuskulären, präkapillären Arteriolen und Kapillaren in der zentralen Gefäßregion, sowie in vergleichbaren Blutgefäßen in der Peripherie des OvLT von TGR konnte die AT₁-IR nicht zuverlässig lokalisiert werden [Abb.16, Teil 2B und 2D]. Dafür zeigen ihre perivaskulären Regionen, ähnlich denen der SDR, eine deutliche großflächige Immunreaktivität. DAB-Markierungen lassen sich intrazellulär oder an den Zellmembranen von großen und kleinen Zellen lokalisieren [Abb.16, Teil 2B und 2D]. Darüber hinaus, zeigen sich DAB-Ablagerungen an zahlreichen kleineren Strukturen in den perivaskulären Regionen dieser Gefäße [Abb.16, Teil 2B und 2D].

III.2.2 AT₁-Rezeptoren im *Organum subfornicale*

III.2.2.1 Im Parenchym und im Kapillarendothel des *Organum subfornicale* von SDR

Das SFO liegt unterhalb der *Fornix* bzw. dem ventralen Abschnitt der *Commissura hippocampi*, am vorderen Dach des 3.Ventrikels [siehe Abb.10C-F]. Es ist, ähnlich dem OvLT, von zahlreichen kleineren Blutgefäßen (5-20 µm im Durchmesser) durchzogen und wird in vier morphologisch voneinander abgrenzbare Regionen (rostral; Übergang; zentral und caudal) unterteilt. Die drei letzten Regionen können aufgrund von zytoarchitektonischer Unterschiede in je eine dorsolaterale und eine ventromediale Zone untergliedert werden, wobei die ventromediale Zone mehr Blutgefäße beinhaltet als die dorsolaterale. In der ventromedialen Zone der Zentral- und Caudalregion ist das Kapillarsystem besonders ausgeprägt. Das SFO wird auf seiner gesamten Länge von großen, immunreaktiven Blutgefäßen (20-60 µm im Durchmesser) flankiert [Abb.17A, 17C, 17E und 17H].

Im Übergangsbereich des SFO lassen sich, im Vergleich zum OvLT, nur wenige Immunsignale identifizieren. Diese sind primär im Parenchym der ventromedialen Zone lokalisiert [17A und 17C]. Dafür zeigen sich im dorsalen Teil der Übergangsregion sowie im oberen Abschnitt seiner ventromedialen Zone einzelne, gut abzugrenzende, immunreaktive

²¹ Aufgrund der geringeren Intensität und der wenig dichten Verteilung der DAB-Niederschläge ist die konzentrisch angelegte Struktur dieser perivaskulären Regionen bei TGR besser zu identifizieren und deutet auf Existenz glatter Muskulatur hin (vergleiche Abbildung.15).

Perikarya [Abb.17A, 17C]. Diese tragen eine eindeutige, massive intrazelluläre DAB-Markierung, wobei sich einige Zellen, aufgrund der gut sichtbaren Axone, als Neurone identifizieren lassen [Abb.18A und 19]. Neben einzelnen immunreaktiven Perikarya werden auch Axone - teilweise auf ihrer gesamten Länge - von DAB-Ablagerungen markiert [Abb.18A und 19]. Einige Kapillaren im Übergangs-SFO zeigen deutliche, aber nicht kontinuierliche DAB-Färbungen in ihren Endothelien [Abb.18A und 19]. In den perivaskulären Regionen weisen neben den intrazellulär markierten Zellen auch zahlreiche kleinere Strukturen punktuelle Immunreaktionen auf - vermutlich Terminalen, Dendriten und Gliakomponenten [Abb.19].

Caudalwärts gewinnt die AT₁-IR im SFO deutlich an Intensität und Fläche [Abb.17E und 17G]. Ähnlich dem OvLT, liegen im zentralen und caudalen SFO die zentralen Gefäße der ventromedialen Zone in lockerem, nicht immunreaktivem Gewebe. Dieses wird umgeben von dichtem immunreaktivem Gewebe - vermutlich den perivaskulären Regionen der zentralen Gefäße [Abb.17E und 17H]. Die Distanz zwischen Blutgefäßen und dem dichteren, immunreaktivem Parenchym lässt auf Beschädigungen durch Zug- und Scherkräfte oder auch Schrumpfung des Gewebes schließen. An der im zentralen bzw. caudalen Abschnitt gelegenen zentralen Gefäßregion lassen sich einzelne immunreaktive Elemente identifizieren.

Abb.17: ANG II-Bindungsstellen im *Organum subfornicale* von SDR und TGR.

Die Abbildung zeigt AT₁-IR anhand zweier coronaler Schnittserien durch das *Organum subfornicale* (SFO). (A-D) zeigen die Übergangsregion, (E-F) die zentrale Region und (G-H) die caudale Region des SFO einer normotensiven SDR (linke Spalte) und einer transgen-hypertensiven TGR (rechte Spalte). Im Übergangsbereich des SFO ist die AT₁-IR vergleichsweise schwach über das gesamte SFO verteilt (* in A-D). Im SFO von SDR lassen sich von DAB-Ablagerungen markierte Neurone ausmachen (schwarze Pfeile in A und C), die bei TGR fehlen. Die SFO beider Rattenstämme sind von AT₁-immunreaktiven Gefäßen flankiert (schwarze Pfeilspitzen in A-H). Caudalwärts nimmt die Immunreaktivität beider SFO in der ventromedialen Zone der zentralen und caudalen Region zu. Hier werden zentral liegende Gefäßsysteme von stark immunreaktivem Gewebe flankiert (* in E-H). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 100 µm.

>

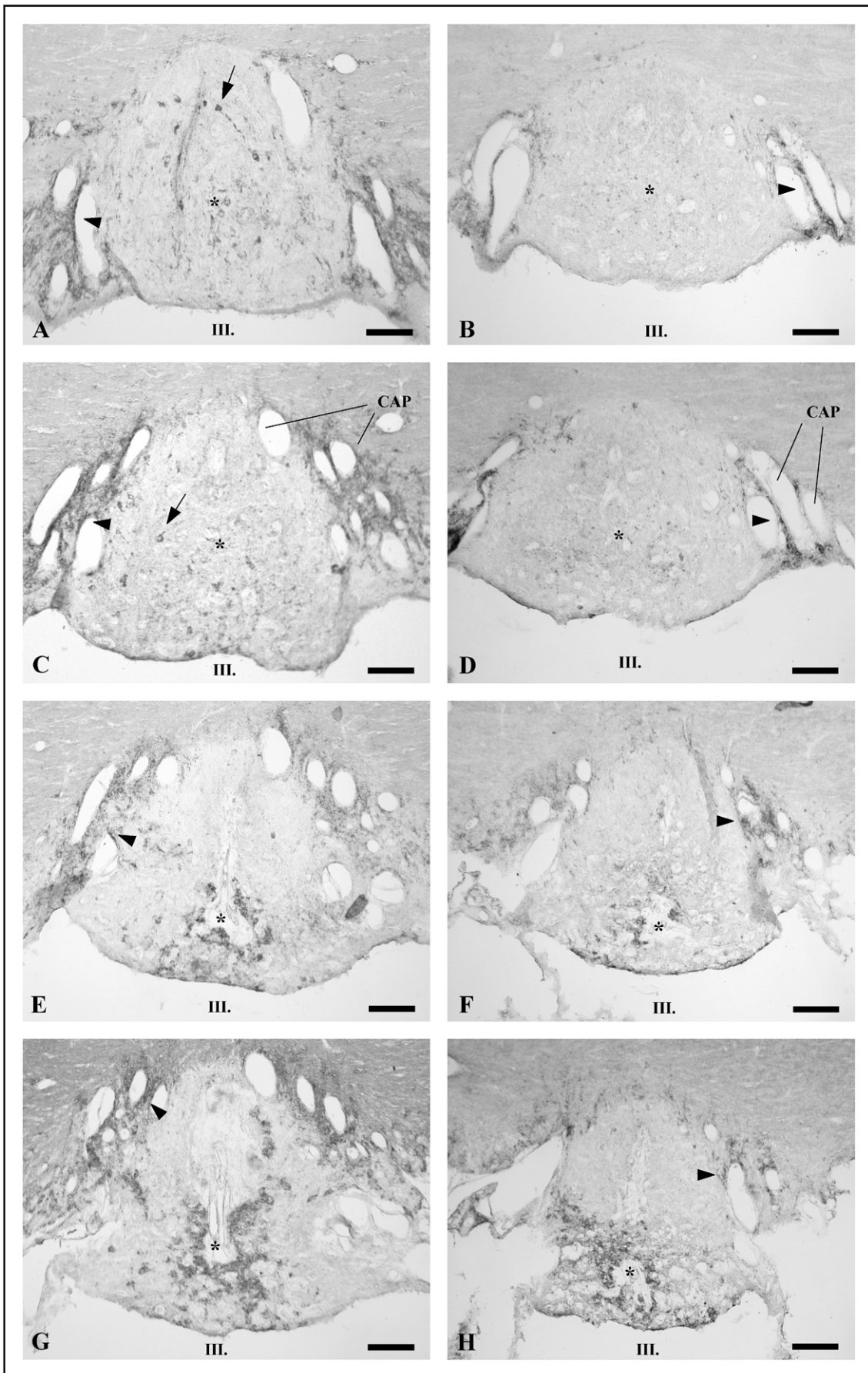


Abb.17:

Zwar zeigen die zentralen Blutgefäße in ihren Endothelien wenig bis gar keine DAB-Ablagerungen, zahlreiche größere und kleinere Zellen in ihren äußeren perivaskulären Regionen, weisen dafür aber massive intrazelluläre und membranständige DAB-Niederschläge auf [Abb.18C]. Darüber hinaus ist eine Vielzahl von immunreaktiven, kleineren Strukturen in einem engen Gürtel um den zentralen Gefäßkanal zu erkennen [Abb.18C]. Immunreaktive Fasern lassen sich weder im zentralen noch im caudalen Abschnitt des SFO ausmachen [Abb.18C].

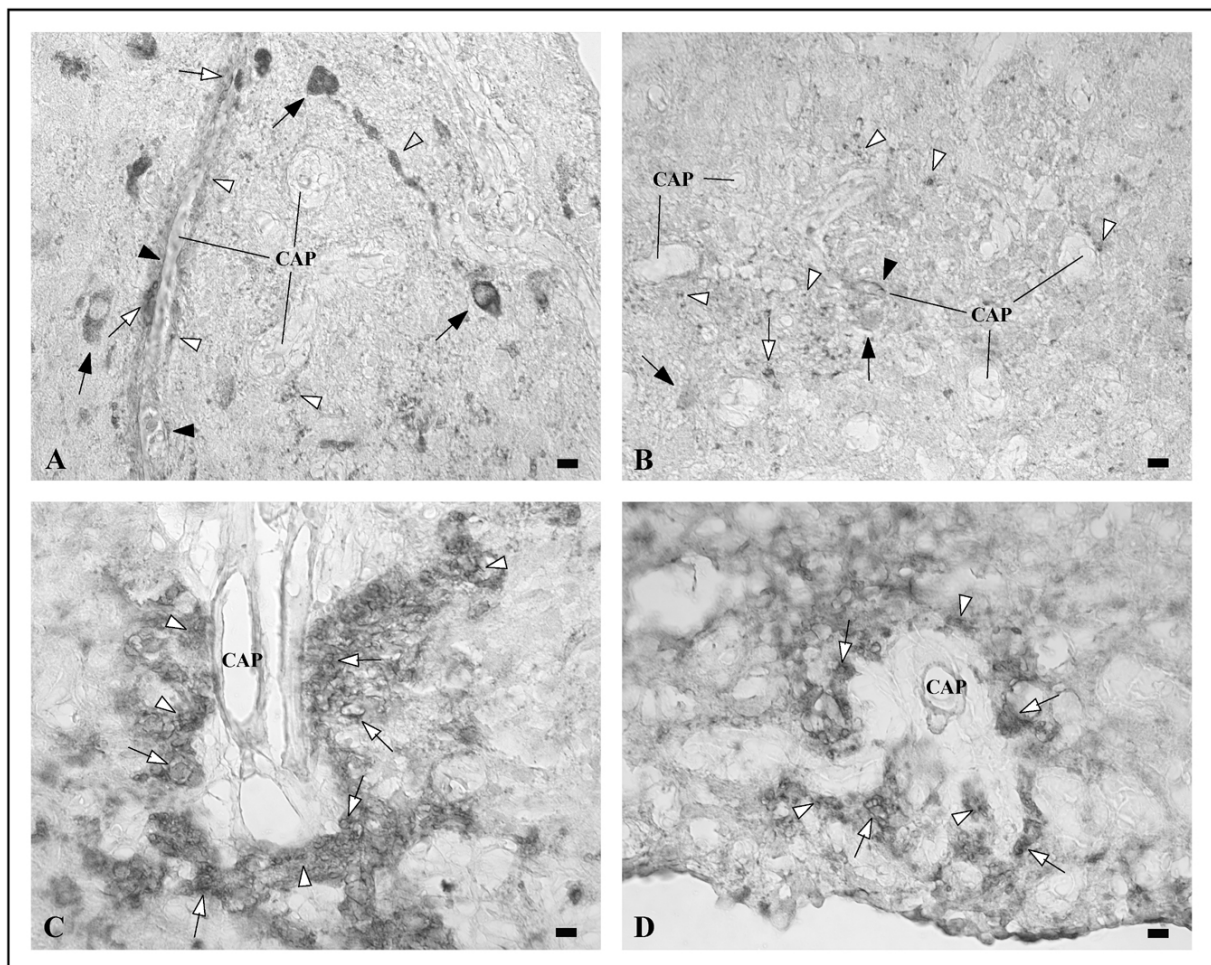


Abb.18: ANG II-Bindungsstellen an Neuronen und Gliazellen des SFO normotensiver und transgen-hypertensiver Ratten.

(A) Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 17A zeigt AT_1 -IR in der Übergangsregion des SFO von SDR. Neurone (schwarze Pfeile in A), axonale Fortsätze (offene Pfeilspitzen in A) sowie Kapillarendothelien (schwarze Pfeilspitzen in A) und an diese anliegende Perikarya (weiße Pfeile in A) sind von DAB-Reaktionsprodukt gefärbt. Des Weiteren lassen sich lokal begrenzte AT_1 -IR in den perivaskulären Regionen der Gefäße ausmachen (weiße Pfeilspitzen in A). (B) Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 17D zeigt AT_1 -IR in der Übergangsregion des SFO von SDR. DAB-Niederschläge finden sich in Perikarya im anterioren Parenchym, meist in der Nähe von Gefäßen (weiße Pfeile in B). Schwach markierte Neurone sind ebenfalls zu erkennen (schwarze Pfeile in B). Klar identifizierbare DAB-Ablagerungen an Axonen fehlen jedoch. Darüber hinaus finden sich im anterioren Parenchym diffus verteilte, meist jedoch in der Nähe von Gefäßen, kleine DAB-Niederschläge - vermutlich an Terminalen, Dendriten und Gliakomponenten (weiße Pfeilspitzen in B). Die Endothelien einiger weniger Kapillaren sind ebenfalls punktuell markiert (schwarze Pfeilspitzen in B). (C und D) Ausschnittsvergrößerungen von Abbildung 17G und 17H zeigen starke AT_1 -IR in der ventromedialen Zone des caudalen SFO beider Rattenstämme. Zahlreiche kleinere Zellen, die in der das zentrale Gefäßsystem begleitende Randzone lokalisiert sind, zeigen DAB-Ablagerungen sowohl in ihren Somata, als auch an ihren Zellmembranen (weiße Pfeile in C und D). Darüber hinaus sind kleine punktuelle DAB-Niederschläge im Parenchym der perivaskulären Region lokalisiert (weiße Pfeilspitzen in C und D). Die Endothelien dieser zentralen Gefäße sind allerdings nur schwach gefärbt. Die AT_1 -IR ist bei SDR im SFO allgemein in der Dichte und Intensität stärker als in TGR. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 10 µm.

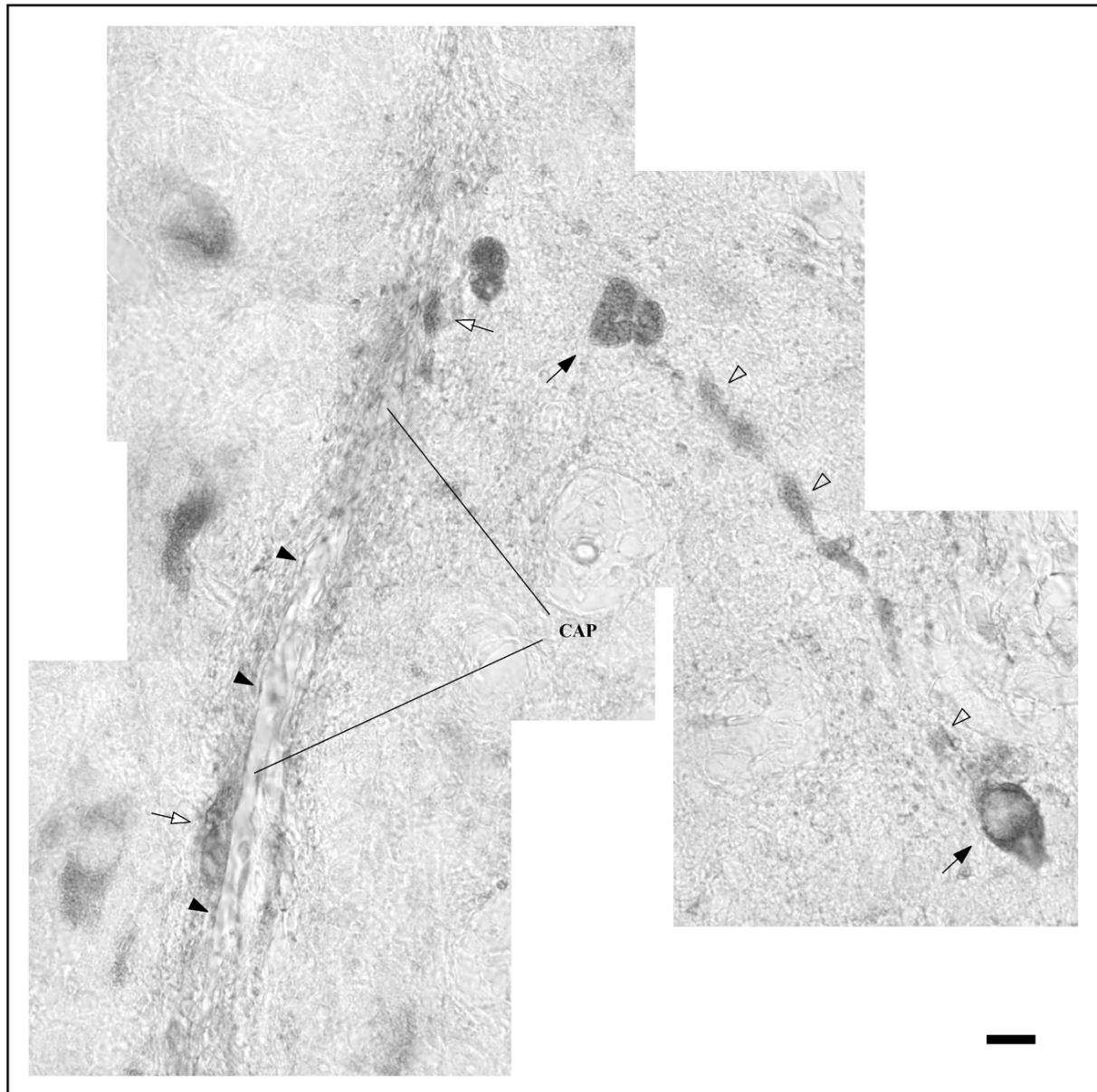


Abb.19: Intrazellulärer Transport von AT₁-Rezeptoren in Neuronen des SFO.

Bildmontage aus hoch vergrößerten Detailaufnahmen aus dem Übergangsbereich des SFO einer normotensiven Sprague-Dawley Ratte zeigen intrazelluläre AT₁-IR in neuronalen Perikarya. Die rechte Bildseite zeigt zwei Perikarya - vermutlich beides Neurone (schwarze Pfeile) -, die über eine fast vollständig mit DAB-Partikeln markierte Faser miteinander verbunden sind (offene Pfeilspitzen). Die linke Bildseite zeigt eine längs getroffene Kapillare, die von markierten Perikarya begleitet wird (weiße Pfeile). Das Endothel selbst weist punktuell ebenfalls Immunsignale auf (schwarze Pfeilspitzen). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 10 µm.

III.2.2.2 Im Parenchym und Kapillarendothel des *Organum subfornicale* von TGR

Der Übergangsbereich des SFO von TGR weist zahlreiche schwache, meist punktuelle Immunsignale auf. Diese sind diffus über das Parenchym der dorsolateralen und ventromedialen Zone verteilt, wobei starke intrazelluläre DAB-Markierungen an Neuronen und deren Axonen - im Gegensatz zu SDR - nicht zu identifizieren sind [Abb.17B und 17D]. Die Dichte und Verteilung des Immunsignals im Parenchym und der darin eingebetteten Gefäße ist im Übergangs-SFO bei TGR deutlich geringer als bei SDR [Abb.17B und 17D].

In dieser Region ist eine intrazelluläre AT₁-IR nur an wenigen größeren und kleineren Zellen lokalisiert. Die Färbung ist hierbei jedoch schwach und erscheint bei den größeren Zellen - vermutlich Neuronen - nur als etwas dunklere Hintergrundfärbung [Abb.18B]. Neben der Dichte und Verteilung ist also auch die Intensität des DAB-Niederschlags bei TGR im Übergangsbereich des SFO deutlich geringer als bei SDR. Klare DAB-Markierungen an axonalen Fortsätzen fehlen im SFO der transgen-hypertensiven Ratten völlig [Abb.18B]. Im Parenchym des Übergangs-SFO, besonders in den perivaskulären Regionen einiger seiner Gefäße finden sich kleinere DAB-Ablagerungen - vermutlich an Terminalen, Dendriten und Gliaelementen [Abb.18B]. Kapillaren zeigen ebenfalls punktuelle Immunsignale in ihren Endothelien [Abb.18B].

Caudalwärts nimmt die AT₁-IR im Zentrum des SFO der TGR deutlich zu. Ähnlich den SDR sind die Immunreaktionen in der zentralen und caudalen Region des SFO um den zentralen Gefäßkanal konzentriert. Dichte und Verteilung der Markierungen sind hierbei aber deutlich geringer als bei den normotensiven Ratten [Abb.17F und 17H].

Im reaktiven Parenchym um den zentralen Gefäßkanal des SFO lassen sich intrazelluläre AT₁-IR in wenigen größeren und zahlreichen kleineren Zellen demonstrieren [Abb.18D]. Hier finden sich außerdem, die ebenfalls bei SDR gesehenen punktuellen DAB-Markierungen an kleineren, lichtmikroskopisch nicht zuzuordnenden Strukturen, diese sind aber weniger dicht lokalisiert [Abb.18D]. Der immunreaktive Gürtel um die zentralen Gefäße ist zudem deutlich schmaler als bei SDR [Abb.18D]. Die zentralen Gefäße zeigen keine oder kaum wahrnehmbare AT₁-IR [Abb.18D]. Alles in allem ist die AT₁-IR im zentralen und caudalen Abschnitt des SFO bei TGR also über eine kleinere Fläche verteilt und weniger dicht.

Die größeren Gefäße (20-60 µm im Durchmesser), welche das SFO flankieren sind bei TGR ebenfalls deutlich durch DAB-Ablagerungen markiert, das Immunsignal erscheint bei allen transgen-hypertensiven Versuchstieren jedoch gegenüber dem der normotensiven Ratten in seiner Dichte und Verteilung kleiner [Abb.17B, 17D, 17F und 17G].

III.2.3 AT₁-Rezeptoren im *Nucleus medianus* der präoptischen Region von SDR

Der MnPO repräsentiert ein unpaares Kerngebiet, welches sich entlang der Mittellinie²² erstreckt. Seine Neurone umgeben hierbei die ventralen, anterioren und dorsalen Teile der *Commissura anterior* (AC). Parallel zum MnPO durchziehen zahlreiche Blutgefäße auf der dorsoventralen Achse die anteriore Wand des 3.Ventrikels [Abb.11A].

Die AT₁-IR im MnPO dorsal der AC ist entlang der Mittellinie leicht zu identifizieren. Wenige Neurone, welche in unmittelbarer Nähe zu den Blutgefäßen liegen sind von DAB-Partikeln markiert [Abb.20A]. Die Neurone zeigen sowohl an ihren Zellmembranen, als auch in ihren Perikarya DAB-Ablagerungen, die sie zur Gänze ausfüllen [Abb.20B-D]. Axonale Fortsätze lassen sich anhand der Immunmarkierung über weite Strecken verfolgen. Sie laufen teils parallel zur Mittellinie und den Gefäßen oder liegen quer zu diesen [Abb.20A und 20D].

Abb.20: Intrazelluläre AT₁-IR in Neuronen im *Nucleus medianus* der präoptischen Region.

(A) Abbildung zeigt ANG II-Bindungsstellen in neuronalen Perikarya im dorsalen *Nucleus medianus* der präoptischen Region (MnPO) (schwarze Pfeile in A). Die markierten Neurone sind auf der Mittellinie oder parallel zu dieser lokalisiert, in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen. (B-D) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen von (A). DAB-Ablagerungen markieren sowohl die Zellmembranen der Neurone, als auch ihre Perikarya zur Gänze (schwarze Pfeile in B-D). Darüber hinaus lässt sich die AT₁-IR über weite Strecken in axonalen Fortsätzen verfolgen (offene Pfeilspitzen in A und D). Interessanterweise sind die Endothelien der Gefäße gar nicht und die perivaskuläre Regionen der ‚Mittellinien-Gefäße‘ nur geringfügig mit DAB-Reaktionsprodukten markiert (weiße Pfeilspitze in C). Abkürzungen: wie zuvor; AC, *Commissura anterior*. Balken in (A) entspricht 100 µm. Balken in (B-D) entsprechen 10 µm. >

²² Die Mittellinie der anterioren Wand des 3.Ventrikels.

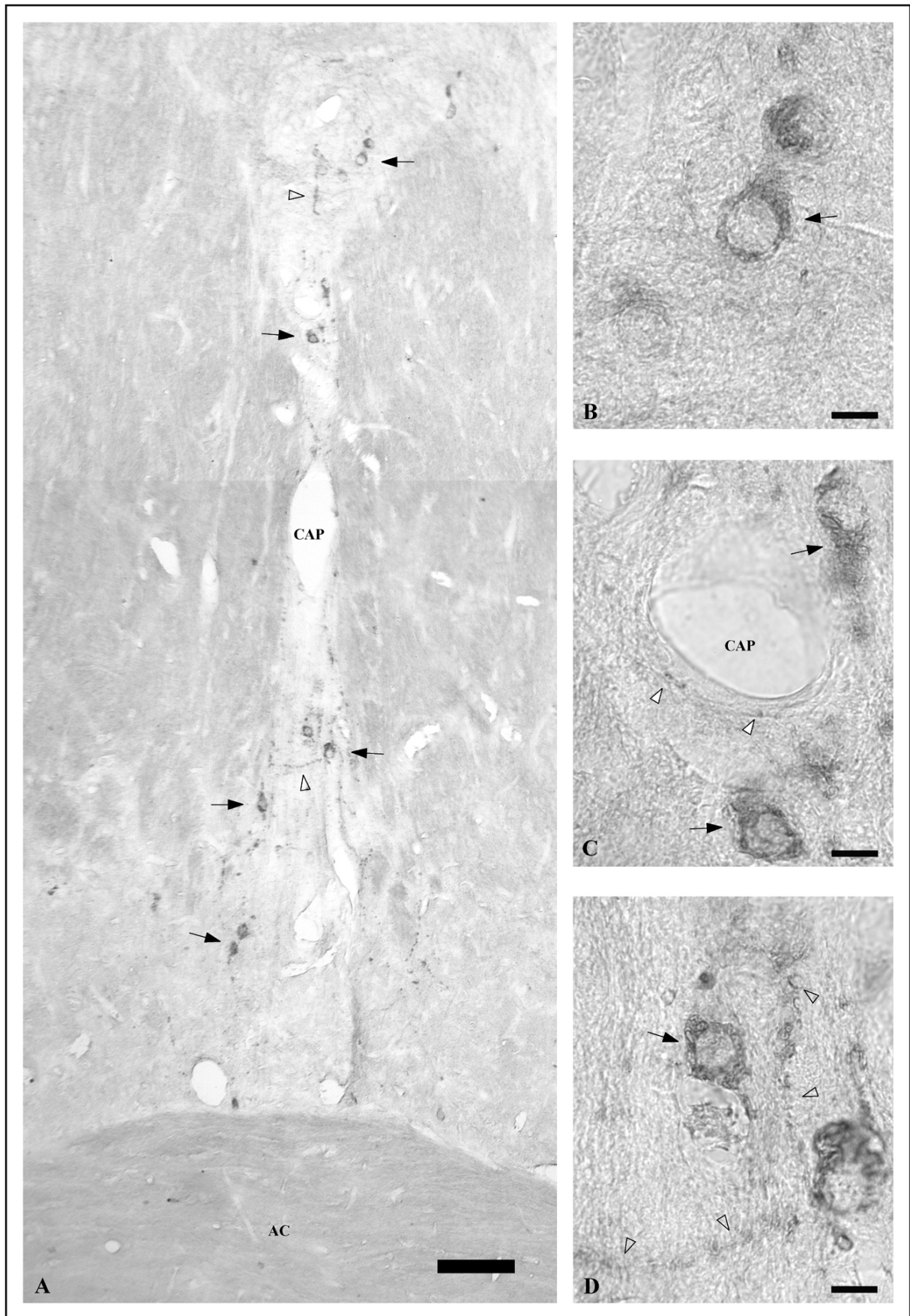


Abb.20:

III.3 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie in den Hirnventrikeln von SDR und TGR

III.3.1 AT₁-Rezeptoren im *Plexus choroideus*

III.3.1.1 Im *Plexus choroideus* von SDR

Der *Plexus choroideus* (ChP) ist am Dach des 3. und 4. Ventrikel und an einem Teil der medialen Wand der lateralen Ventrikel lokalisiert und reicht bis tief in letztere hinein [siehe auch Abb.11B]. Er gilt als die Hauptquelle des *Liquor cerebrospinalis* und ist eine gefäß- und nervenreiche Einstülpung der *Pia mater*, deren zottenreiche Oberfläche von einem einschichtigen Ependym überzogen ist.

Geringere lichtmikroskopische Vergrößerungen zeigt bei SDR eine Vielzahl von AT₁-IR im Ependym des ChP. Die Immunreaktionen erscheinen hierbei unregelmäßig und nicht kontinuierlich über das gesamte Ependym verteilt [Abb.21A].

Höhere Vergrößerungen demonstrieren AT₁-IR an und in zahlreichen ependymalen Zellen. Die DAB-Partikel sind hier klar an den Zellmembranen und innerhalb der Perikarya der Ependymzellen zu identifizieren und füllen diese teilweise vollständig aus [Abb.22A-B]. Der überwiegende Teil des Ependyms zeigt jedoch nur vereinzelte Immunfärbungen an den Zellmembranen oder bleibt frei von DAB-Ablagerungen. Darüber hinaus sind eindeutige, aber nicht kontinuierliche Immunreaktionen an den Blutgefäßen des ChP zu erkennen. DAB-Niederschläge finden sich hier vorwiegend in den perivaskulären Regionen der Gefäße und lassen AT₁-IR an axonalen Terminalen und Dendriten vermuten [Abb.22A-B]. DAB-Ablagerungen sind aber auch - wenn gleich in geringeren Umfang - im Endothel der Gefäße lokalisiert [Abb.22A-B]. Erst höher vergrößerte Lichtmikroskopie ermöglicht eine Differenzierung zwischen ependymalen und supraependymalen Zellen - vermutlich makrophage Epiplexuszellen -, die auf dem Ependym des ChP lokalisiert sind und eine vollständige intrazelluläre AT₁-IR zeigen [Abb.22.B].

Die Gefäßwände weisen ähnlich den Ependymzellen eine uneinheitliche Färbung auf, d.h. zahlreiche Endothelien zeigen keine Immunreaktion, während andere vereinzelte, aber deutlich sichtbare DAB-Partikel aufweisen [Abb.22A-B].

Abb.21: ANG II-Bindungsstellen im *Plexus choroideus* der lateralen Ventrikel.

(A und B) Übersichtsaufnahmen des *Plexus choroideus* (ChP) im lateralen Ventrikel einer normotensiven SDR (A) und einer transgen-hypertensiven TGR (B). Die ChP beider Rattenstämme zeigen eine deutliche AT₁-IR. Zahlreiche Perikarya im Ependym des ChP sind von DAB-Ablagerungen markiert (schwarze Pfeile in A und B). Die AT₁-IR im ChP ist in ihrer Dichte und Intensität bei SDR höher als bei TGR. Dies entspricht der Immunreaktivität am lateralen und dorsalen Ependym des Ventrikels (° in A). Im Gegensatz hierzu, erscheint das Immunsignal in benachbarten Strukturen, wie dem ventrikelnahen Teil des *Caudatum putanem* (CP) sowie einer Kapillarregion zwischen *Cingulum* (cg) und *Corpus callosum* (CC) in seiner Verteilung und Intensität größer bzw. stärker (* in B). Interessanterweise sind immunreaktive Strukturen, wie z.B. einzelne Perikarya im *Nucleus septalis lateralis* (dorsaler Teil; LSD) bei SDR intensiver markiert als bei TGR (offene Pfeile in A). Bei letzteren erscheint das Areal der AT₁-IR im LSD allerdings deutlich größer, wenn gleich die markierten Strukturen weniger deutlich hervor treten als bei SDR (# in A und B). Rahmen in (A und B) zeigen Regionen die in den Abbildungen 22A-D in höherer Vergrößerung dargestellt sind. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 100 µm.

>

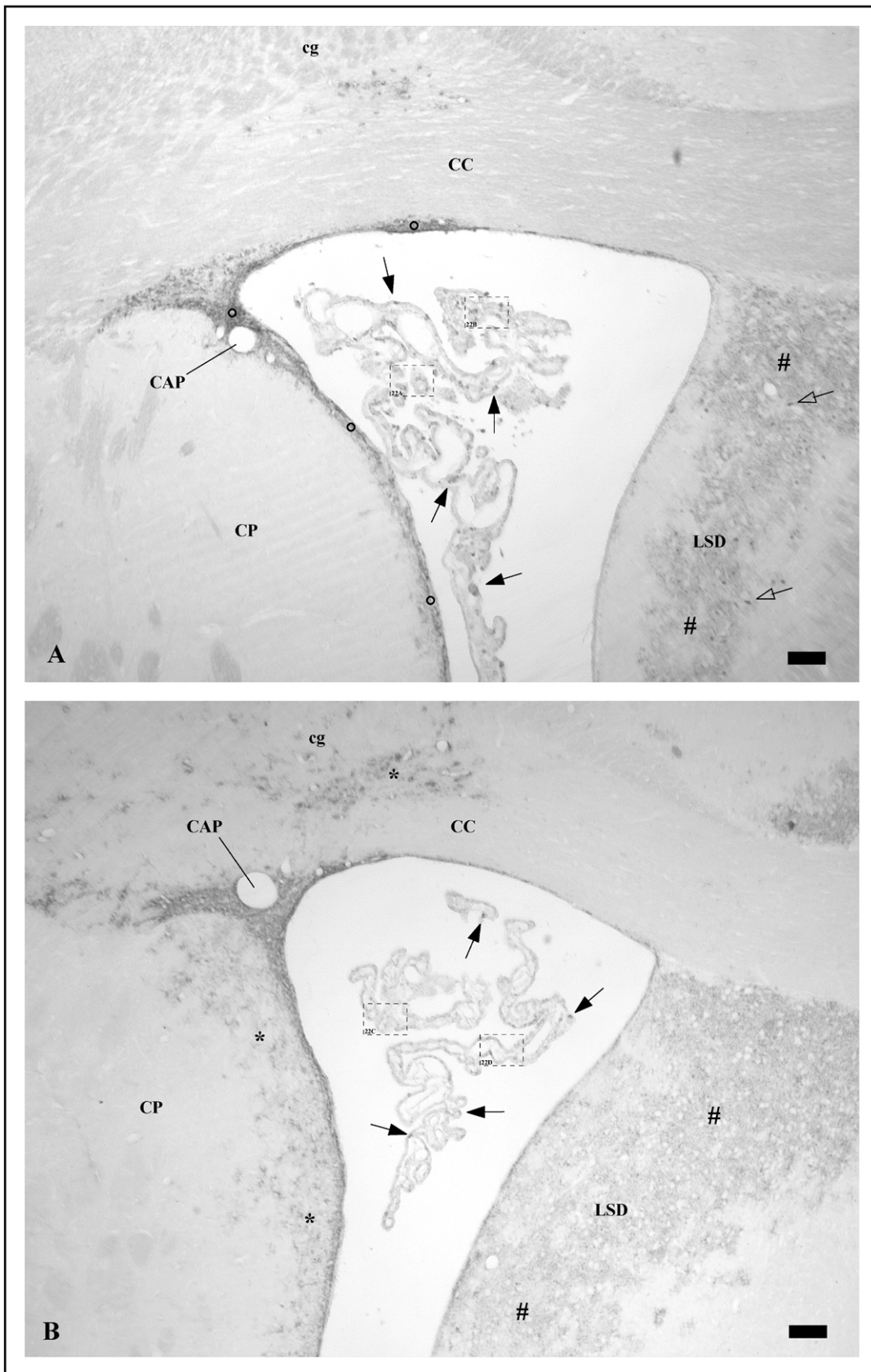


Abb.21:

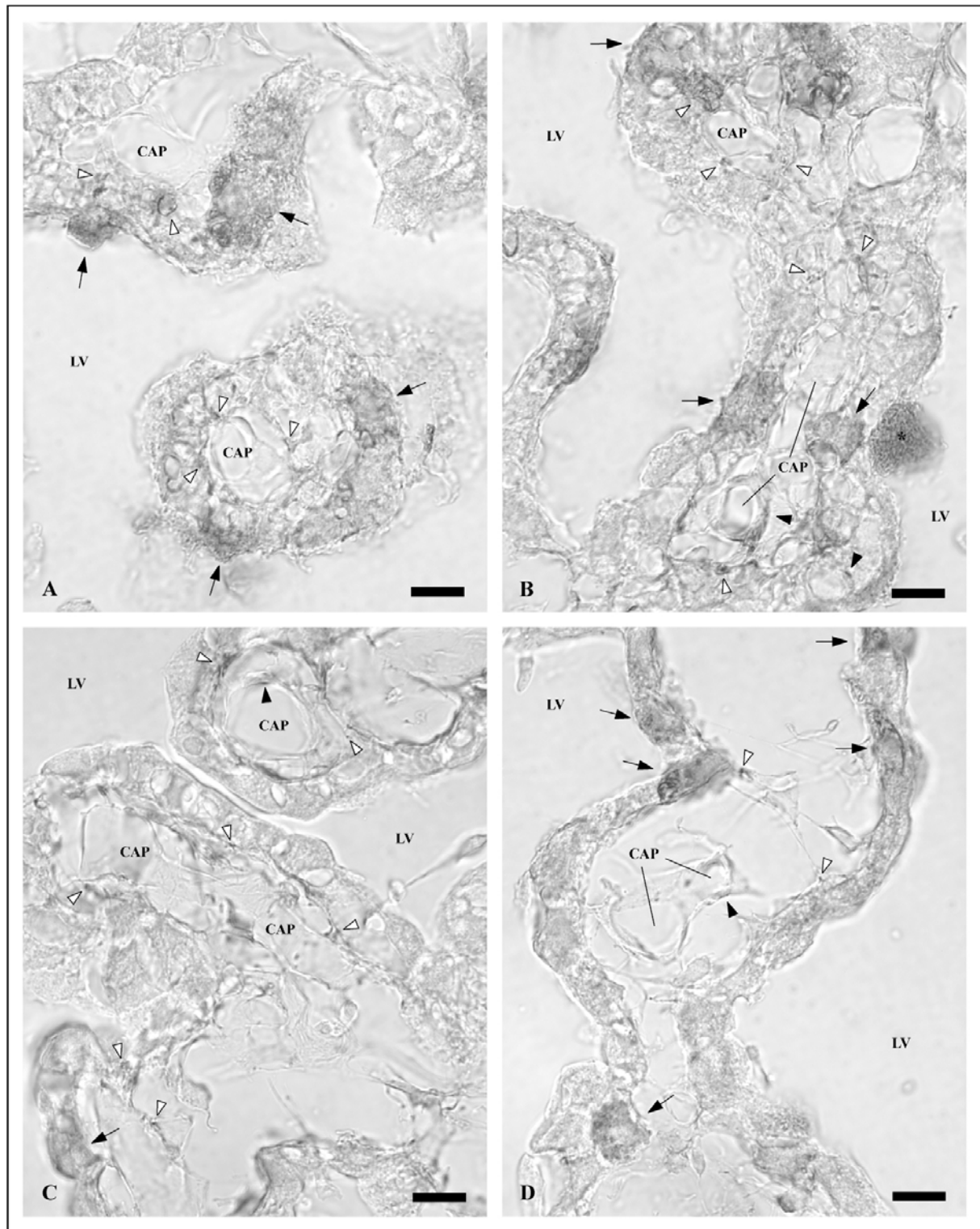


Abb.22: AT₁-IR in Ependym und Endothelien des *Plexus choroideus* der lateralen Ventrikel.

Ausschnittsvergrößerungen aus Abbildung 21A, respektive 21B (90° im Uhrzeiger gekippt) zeigen AT₁-IR in unterschiedlichen Strukturen des *Plexus choroideus* (ChP) von SDR (A und B) und TGR (C und D). Intrazelluläre DAB-Niederschläge finden sich in ependymalen Zellen des ChP (schwarze Pfeile in A-D). Schwache Immunreaktionen sind im Endothel von Blutgefäßen zu identifizieren (schwarze Pfeilspitzen in B-D). Die perivaskulären Regionen der Gefäße zeigen eine deutlich höherer AT₁-IR (weiße Pfeilspitzen in A-D). Des Weiteren markiert das DAB-Reaktionsprodukt auf der Liquorseite (LV) des Ependyms liegende Zellen (*) in B) - vermutlich makrophage Epiplexuszellen. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 10 µm.

III.3.1.2 Im Plexus choroideus von TGR

Geringere lichtmikroskopische Vergrößerungen zeigen bei TGR ebenfalls diffus über das Ependym verteilte AT₁-IR. Die Immunsignale sind jedoch - bis auf wenige Perikarya - von geringerer Intensität und Dichte als bei SDR. D.h., nur wenige ependymale Zellen tragen eine hier sichtbare DAB-Markierung [Abb.21B].

Höhere Vergrößerungen demonstrieren AT₁-IR an und in ependymalen Zellen des ChP von TGR. Die DAB-Niederschläge sind hier, ähnlich der SDR, klar an den Zellmembranen sowie intrazellulär zu identifizieren [Abb.22C-D]. Es sind allerdings deutlich weniger Zellen vollständig vom DAB-Niederschlag markiert [Abb.21B und Abb.22C-D]. Große Teile des Ependyms zeigen nur vereinzelt Immunfärbungen an den Zellmembranen. Der überwiegende Teil der ependymalen Zellen bleibt frei von DAB-Ablagerungen.

Immunreaktionen an den Blutgefäßen des ChP transgen-hypertensiver Ratten liegen ebenfalls vor. DAB-Ablagerungen zeigen sich hier, ähnlich wie bei SDR, vorwiegend in den perivaskulären Regionen der Gefäße und lassen AT₁-IR an axonalen Terminalen und Dendriten vermuten [Abb.22C-D]. DAB-Ablagerungen sind im selben Umfang wie bei SDR im Endothel der Gefäße lokalisiert, wobei die Färbung der Gefäße insgesamt uneinheitlich ist [Abb.22C-D].

Bei allen untersuchten Tieren erscheint das Immunsignal bei den transgen-hypertensiven TGR in seiner Dichte und Verteilung im ChP geringer als bei normotensiven SDR [Abb.21A-B]. Dort wo DAB-Niederschlag Perikarya und größere Strukturen markiert, ist die Intensität der Färbung zwischen TGR und SDR vergleichbar, zeigt sich bei TGR jedoch lokal begrenzter als bei SDR [Abb.22A-D].

III.3.2 AT₁-Rezeptoren im Ependym der lateralen Ventrikel

III.3.2.1 Im Ependym der lateralen Ventrikel von SDR

Selbst geringere lichtmikroskopische Vergrößerung zeigt, dass das Ependym der lateralen Ventrikel sowie das direkt daran angrenzende Gewebe fast durchgehend schwach, respektive stark immunreaktiv gegen den AT₁-Antikörper sind [Abb.23A]. Das Immunsignal ist im und besonders unter dem Ependym über weite Strecken kontinuierlich und lichtmikroskopischer Ebene sichtbar. Am dorsolateralen Rand des 1. und 2.Ventrikels, zwischen *Caudatum putanem* (CP) und *Corpus callosum* (CC), ist die Immunreaktion des Ependyms und speziell des darunter liegenden Gefäßsystems besonders deutlich [Abb.23A]. Auch in der daran anschließenden Region sind klare Immunreaktionen zu beobachten [Abb.23A]. Hier formen die Wände der lateralen Ventrikel einen nahezu recht Winkel, in dessen Flucht ein zell- und gefäßreiches Gebiet liegt. Dieses spitze, hornförmige Areal schiebt sich zwischen den dorsalen Abschnitt des *Caudatum putanem* und den *Corpus callosum* [siehe auch Abb.11C]. Hohe lichtmikroskopische Vergrößerung demonstriert, dass das Ependym an dieser Position geringe - aber trotzdem wahrnehmbare - DAB-Ablagerungen aufweist und dass das direkt dem Ependym anliegende Gewebe hier eine besonders starke und kontinuierliche Immunantwort zeigt [Abb.24A]. Zahlreiche kleine, direkt an das Ependym grenzende Zellen sind intrazellulär oder Zellmembranständig von DAB-Partikeln markiert [Abb.24A].

Im zell- und gefäßreichen Gewebe zeigen viele Zellen in ihren Perikarya oder an ihren Zellmembranen eindeutige AT₁-IR. In einigen Zellen lassen sich massive DAB-Ablagerungen identifizieren [Abb.24C]. Größere Gefäße und Kapillaren, die in dieser immunreaktiven Zone lokalisiert sind, weisen zahlreiche kleine Immunsignale in ihren perivaskulären Regionen auf, welche auf ANG II-Bindungsstellen an Terminalen, Dendriten und Gliaelementen schließen lassen [Abb.24C]. Gleichfalls zeigen sie auch - wenn gleich in geringerem Umfang - AT₁-IR in ihren Endothelien [Abb.24A und Abb.24D].

Abb.23: ANG II-Bindungsstellen im Ependym der lateralen Ventrikel und angrenzenden Regionen.

(A und B) Übersichtsaufnahmen des dorsolateralen Seite des Ependyms eines lateralen Ventrikels (LV) sowie des benachbarten zell- und gefäßreichen Areals zwischen *Caudatum putanem* (CP) und dem *Corpus callosum* (CC) einer normotensiven SDR (A) und einer transgen-hypertensiven TGR (B) (vergleiche Abb.11C). Das Ependym beider Rattenstämme bzw. das direkt dahinter liegende Gewebe zeigt eine starke AT₁-IR (schwarze Pfeile in A und B). Angrenzende Gefäße weisen ebenfalls eine deutliche AT₁-IR auf (schwarze Pfeilspitzen in A und B). Darüber hinaus sind in dem in der Flucht des fast rechtwinklig zulaufenden Ependyms liegenden Areal zahlreiche ANG II-Bindungsstellen zu erkennen (siehe Rahmen der Ausschnittsvergrößerungen von A und B). Die AT₁-IR erscheint in ihrer Intensität bei SDR lokal größer als bei TGR (° in A). Allerdings ist die Dichte der Immunreaktion bei TGR gesamt gesehen höher (* in B). Balken entsprechen 100 µm. >

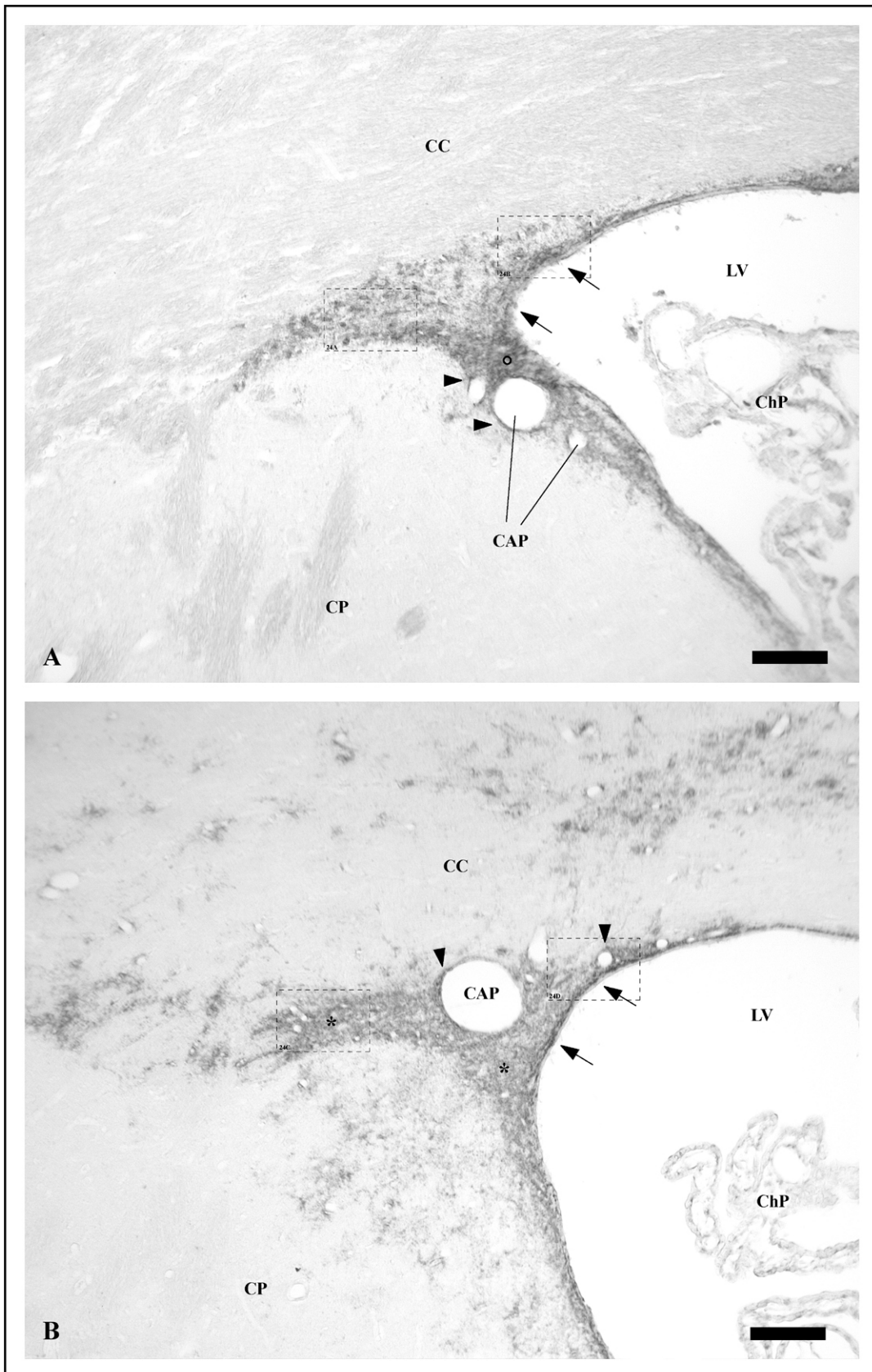


Abb.23:

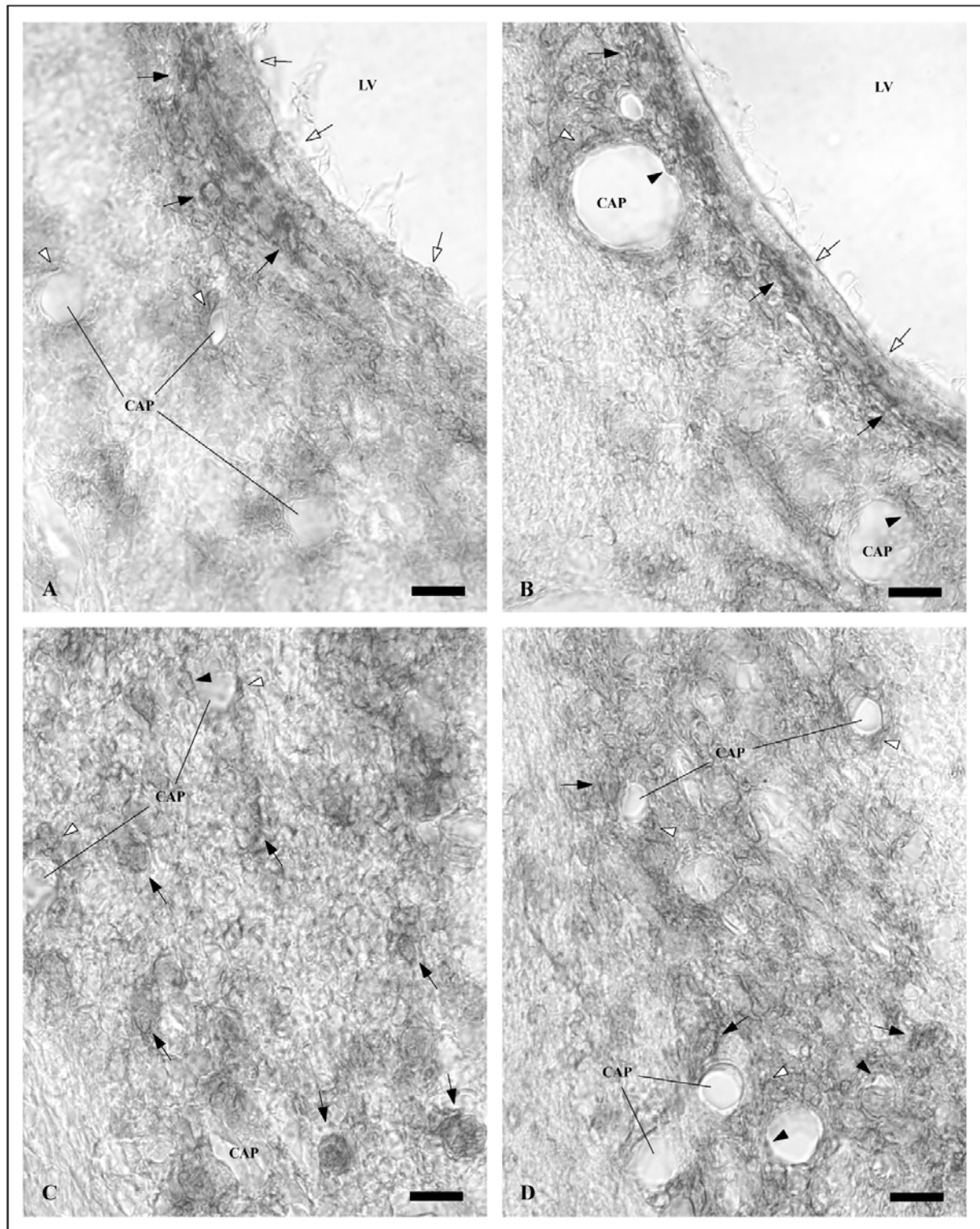


Abb.24: AT₁-IR im Ependym der lateralen Ventrikel und angrenzenden Regionen.

Ausschnittsvergrößerungen aus Abbildung 23A, respektive 23B (90° gegen den Uhrzeiger gekippt) zeigen AT₁-IR im dorsolateralen Ependym und in daran angrenzenden Arealen von SDR (A und C) und TGR (B und D). Starke DAB-Niederschläge finden sich im subependymalen Gewebe (schwarze Pfeile in A und B). Das Ependym selbst zeigt nur geringe DAB-Markierungen (offene Pfeile in A und B). In einiger Entfernung vom Ependym lassen sich eindeutige intrazelluläre und Zellmembranständige DAB-Markierungen identifizieren (schwarze Pfeile in C und D). Im Endothel von größeren Gefäßen und Kapillaren (schwarze Pfeilspitzen in A-D) sowie in deren perivaskulären Regionen (weiße Pfeilspitzen in A-D) zeigen sich ebenfalls DAB-Ablagerungen. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 10 µm.

III.3.2.2 Im Ependym der lateralen Ventrikel von TGR

Bei TGR ist das Ependym der lateralen Ventrikel ebenfalls durchgehend schwach und das direkt anliegende Gewebe stark immunreaktiv gegen den AT₁-Antikörper [Abb.23B].

Kleinere lichtmikroskopische Vergrößerung zeigt auch bei TGR kräftige Immunantworten im dorsolateralen Bereich der lateralen Ventrikel sowie der daran anschließenden Region [Abb.23B]. Von ihrem Erscheinungsbild her ist die Immunfärbung bei den transgenhypertensiven Tieren in dieser Region weniger intensiv als bei ihren normotensiven Kontrollen, jedoch wirkt die Färbung dichter und erstreckt sich bei allen transgenhypertensiven TGR über eine größere Fläche [Abb.23B].

Höhere Lichtmikroskopie ermöglicht auch hier die Identifizierung von DAB-Ablagerungen im Ependym und dem direkt anliegenden Gewebe. Besonders starke und kontinuierliche Immunreaktionen sind im subependymalen Gewebe sowie an seinen Kapillaren und größeren Gefäßen zu lokalisieren [Abb.24B]. Zahlreiche kleine, direkt an das Ependym grenzende Zellen sind, wie bei SDR, intrazellulär oder Zellmembranständig von DAB-Niederschlägen markiert [Abb.24B]. Im zell- und gefäßreichen Gewebe, weiter lateral des Ependyms, ist das DAB-Reaktionsprodukt in TGR gleichmäßiger verteilt als in SDR, zeigt aber keine so massive Akkumulation von DAB-Partikeln in Perikarya oder an ihren Zellmembranen wie bei den normotensiven Ratten [Abb.24D]. Größere Gefäße und Kapillaren, die in der ventrikelfernen immunreaktiven Zone lokalisiert sind, weisen ebenfalls zahlreiche deutliche Immunsignale in ihren perivaskulären Regionen auf, die in ihrer Dichte und Intensität denen der SDR entsprechen [Abb.24D]. In den Endothelien dieser Gefäße sind wie in ihren Gegenstücken bei SDR nur geringe DAB-Ablagerungen lokalisiert [Abb.24D].

III.3.3 AT₁-immunreaktive supraependymale Zellcluster in den lateralen Ventrikeln

Beiden untersuchten Stämmen ist gemein, dass sich am Ependym der lateralen Ventrikel, aber nicht im 3.Ventrikel, vereinzelte supraependymale Aufwölbungen der Ventrikelwand zeigen, die von ihrer Gestalt Ähnlichkeit mit der auf dem Ependym des *Plexus choroideus* dargestellten Epiplexuszelle in Abbildung 22B haben [Abb.25 Teil 1A]. Eine genaue Zählung dieser Gebilde erfolgte weder bei SDR noch bei TGR. Eine grobe Durchsicht zeigte jedoch, dass AT₁-immunreaktive supraependymale Zellcluster nur in geringer Menge in den lateralen Ventrikeln vorkommen und bei keinem Stamm eine signifikante Häufung zu registrieren war. Sowohl bei SDR, als auch bei TGR weisen sie über ihre gesamte Fläche eine massive Immunreaktivität gegen den AT₁-Rezeptorantikörper auf [Abb.25 Teil 1B-D], konnten jedoch bei parallelen Immunfärbungen gegen Vasopressin nicht markiert werden [ohne Abbildung]. Strukturelle Verbindungen zum unter dem Ependym befindlichen Gefäßsystem sind nicht zu identifizieren. Weder bei normotensiven noch bei transgen-hypertensiven Ratten ließ sich eine Häufung dieser supraependymaler Aufwölbungen oder eine Schwankung in der Färbeintensität feststellen.

Mehtylenblaufärbungen zeigen, dass es sich bei diesen runden bis ovalen Gebilden auch um ependymale Hohlräume handeln könnte. Das heißt, im Gegensatz zu den einschichtigen Einstülpungen des Ependyms des 3.Ventrikels²³ und den einzelligen supraependymalen Makrophagen umgibt ein einschichtiges Epithel - vermutlich das Ependym - einen Hohlraum von bis zu ca. 40 µm (im Durchmesser), der von mehreren Zellen ausgefüllt wird [Abb.25 Teil 2A-B].

²³ Auf Höhe des *Nucleus paraventricularis* (PVN) finden sich in der Wand des 3.Ventrikels kleine einschichtige Einstülpungen des Ependyms. Diese können in Horizontal- und Coronal Schnitten als Lokalisationshilfe des PVN dienen.

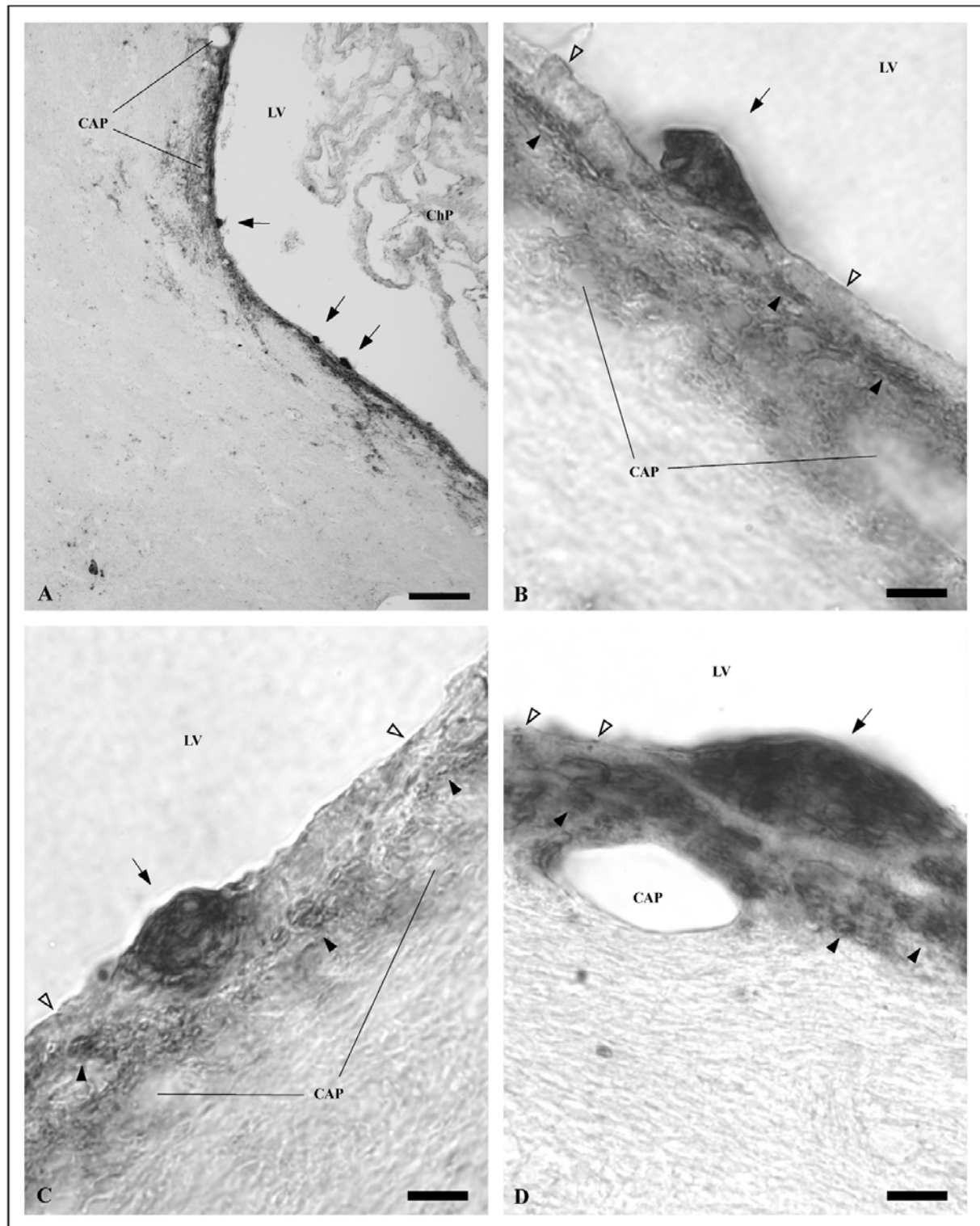


Abb.25 Teil 1:

Abb.25 Teil 1: Supraependymale Zellcluster auf dem Ependym normotensiver SDR zeigen eine massive AT₁-IR.

(A) Die Übersichtsaufnahme zeigt drei supraependymale, immunreaktive Aufwölbungen des Ependyms eines lateralen Ventrikels einer normotensiven SDR (schwarze Pfeile in A). (B und C) Die Ausschnittvergrößerungen von (A) demonstrieren die massive AT₁-IR zweier supraependymalen Zellclusters (schwarze Pfeile in B und C). (D) Die hoch vergrößerte lichtmikroskopische Aufnahme der AT₁-IR eines supraependymalen Zellclusters einer transgen-hypertensiven TGR demonstriert massive intrazelluläre DAB-Ablagerungen (schwarzer Pfeil in D). Das dem Ependym unterliegende Gewebe ist von Hohlräumen und Gefäßen unterschiedlicher Größe durchzogen und zeigt ebenfalls eine Immunreaktion. Diese ist bei Strukturen in direktem und näheren Kontakt mit dem Ependym besonders stark ausgeprägt (schwarze Pfeilspitzen in B-D). Das Ependym selbst weist eine eher schwache aber gleich bleibende Hintergrundfärbung auf, die nur lokal begrenzt deutlicher ausfällt (offene Pfeilspitzen in B-D). Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A) entspricht 100 µm. Balken in (B-D) entsprechen 10 µm.

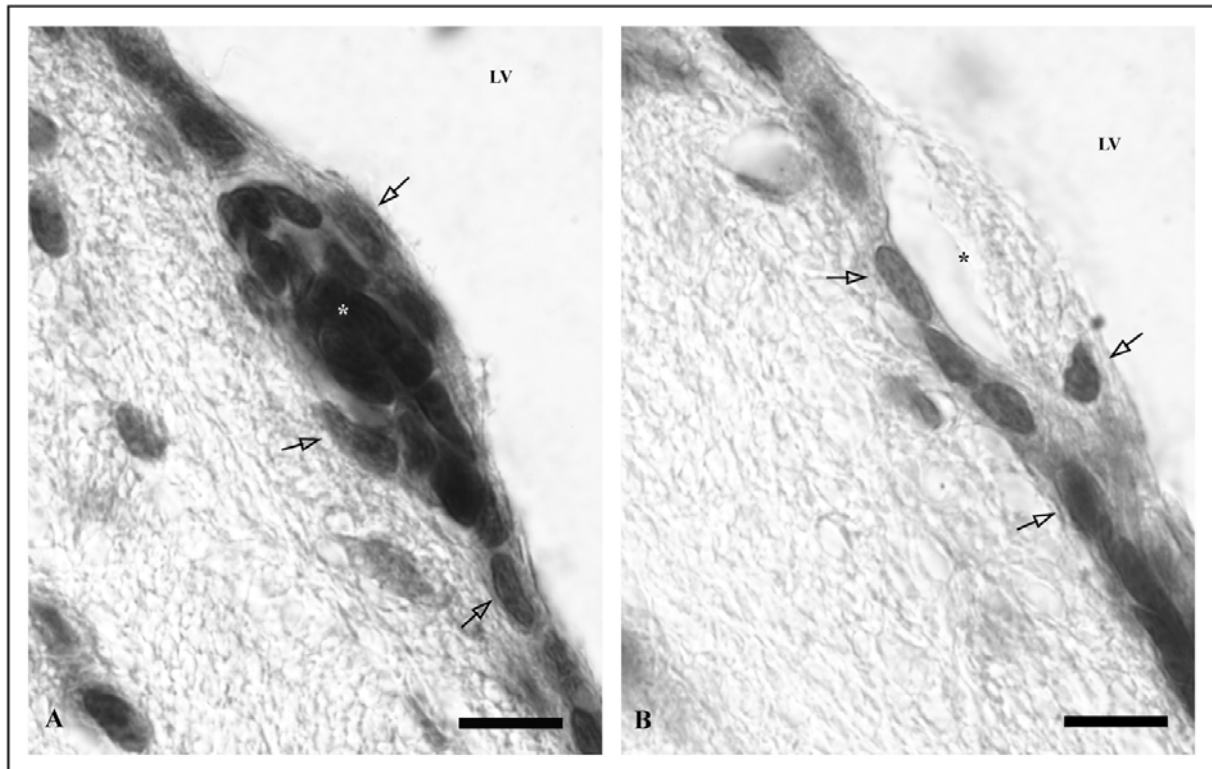


Abb.25 Teil 2:

Abb.25 Teil 2: Hohlräume im Ependym normotensiver SDR beherbergen Zellen unbekannter Herkunft.

(A-B) Methylenblaufärbungen demonstrieren ependymale Hohlräume, deren einschichtiges Epithel (offene Pfeile in A und B) einen Zellhaufen unbekannter Natur (* in A) umgibt. Im Laufe des Schnittprozesses kann das einschichtige Epithel aufreißen und seinen Inhalt freigeben, sodass ein leerer Hohlraum zurück bleibt (* in B). Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A und B) entsprechen 10 µm.

III.3.4 AT₁-immunreaktive Tanyzyten im Ependym des 3.Ventrikels

Im Verlauf der Studie zur AT₁-IR im SCN und seiner Umgebung wurden in der retrochiasmatischen Region (RCh) [siehe auch Abb.11D] beider Rattenstämme AT₁-IR axonähnlich Zellfortsätze entdeckt. Nähere Untersuchungen konnten den Ursprung der bis zu 400 µm langen Fasern innerhalb des Ependyms des 3.Ventrikels zeigen²⁴ [Abb.26A, 26C, 26E und 26F]. Eingebettet zwischen den palisadenartig aufgereihten Zellen des Ependyms, die eine schwächere AT₁-IR zeigen, liegen die Perikarya der Tanyzyten²⁵ [Abb.26B, 26D und 26G], deren Fasern über große Entfernungen bis in den Hypothalamus reichen.

Beginnend etwa 150 µm caudal des SCN erstrecken sich AT₁-IR Tanyzyten über große Teile des Ventrikelbodens [Abb.26A, 26C und 26E] und reichen bis ca. 500 µm an dessen lateralen Wänden hinauf [Abb.26F]. Der überwiegende Teil der AT₁-immunreaktiven Tanyzyten ist im anterioren Bereich des Ventrikels lokalisiert. Ihre Anzahl verringert sich zum zentralen Teil hin und wächst in Richtung des caudalen Endes wieder an [Abb.27].

DAB-Reaktionsprodukte markieren sowohl die Perikarya der Tanyzyten zur Gänze [Abb.26B, und 26D], als auch ihre axonartigen Fasern auf deren gesamten Länge [Abb.26D].

Die im Ventrikelboden lokalisierten Tanyzyten entsenden ihre Fasern großteils in Richtung der *Eminentia mediana* [Abb.26C und 26E], während die Fasern der in den lateralen Wänden liegenden Zellen in die mediale, bzw. bis weit in die laterale retrochiasmatische Region ziehen [Abb.26A und 26C]. In der medialen RCh sind die Faserendigungen teils direkt an AT₁-IR Endothelien von Blutgefäßen lokalisiert [Abb.26D und 26G]. Besonders die Fasern, der im anteroventralen Bereich des 3.Ventrikels liegenden Tanyzyten, gelangen in die mittelbare Nachbarschaft des SCN [Abb.27].

Abb.26: AT₁-Rezeptoren in Tanyzyten im Ependym des 3.Ventrikels und in deren Fortsätzen.

Aufnahmen zeigen AT₁-IR in einer coronalen Schnittserie durch die retrochiasmatische Region. Schnitte liegen ca. 450 µm (A), 500 µm (C), 600 µm (E) und 700 µm (F) caudal des *Nucleus suprachiasmaticus*. (B, D und G) Ausschnittsvergrößerungen von (A, B und F). AT₁-immunreaktive Tanyzyten sind am Boden und im ventrolateralen Ependym des 3.Ventrikels lokalisiert (schwarze Pfeile in A, C, E und F) und entsenden ihre axonähnlichen Fortsätze in die retrochiasmatische Region (RCh) (* in A und F) und in die unter dem Ventrikel positionierte *Eminentia mediana* (ME) (* in C und E). Tanyzytenperikarya sind stark mit DAB-Ablagerungen markiert (schwarze Pfeile in B und D), während das restliche Ependym nur eine schwache AT₁-IR zeigt. Die axonähnlichen Fortsätze sind fast vollständig durch DAB-Partikel gefärbt und haben Kontakte zu Blutgefäßen in der medialen RCh (schwarze Pfeilspitzen in D und G) oder ziehen in Richtung der lateralen RCh (offene Pfeilspitze in D und G). Abkürzungen: wie zuvor; Balken in (A, C, E und F) entsprechen 100 µm. Balken in (B, D und G) entsprechen 10 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [126]. >

²⁴ Veröffentlicht in M.A. Thomas, G. Fleissner, S. Hauptfleisch, B. Lemmer, Localization of angiotensin II (AT₁)-receptor-immunoreactive fibres in the hypothalamus of rats: angiotensin II-sensitive tanycytes in the ependyma of the third ventricle?. Brain Res. 967 (2003) 281-284.

²⁵ Die Zellen neuroglialer Herkunft verfügen über sehr lange axonartige Zellfortsätze. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt.

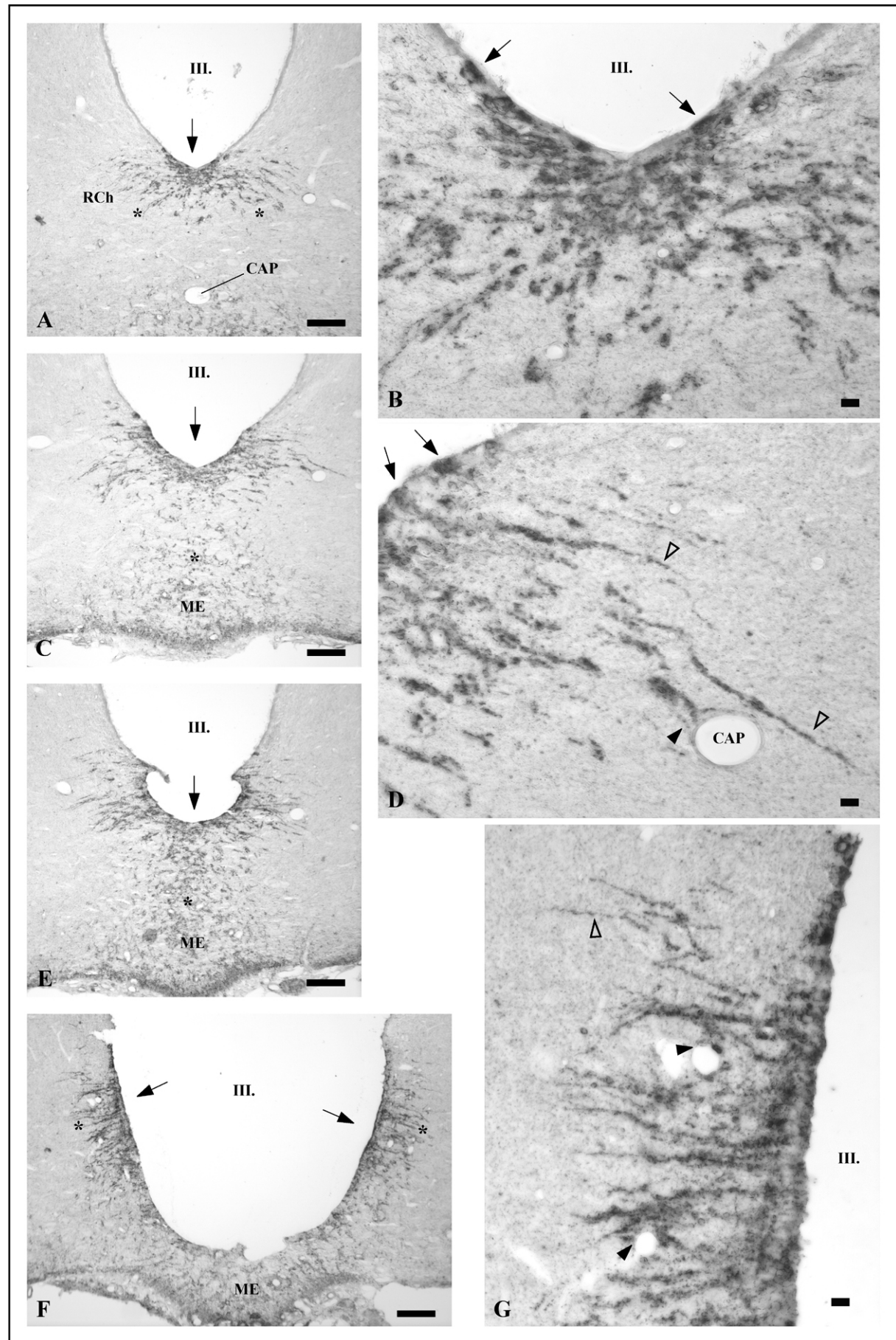


Abb.26:

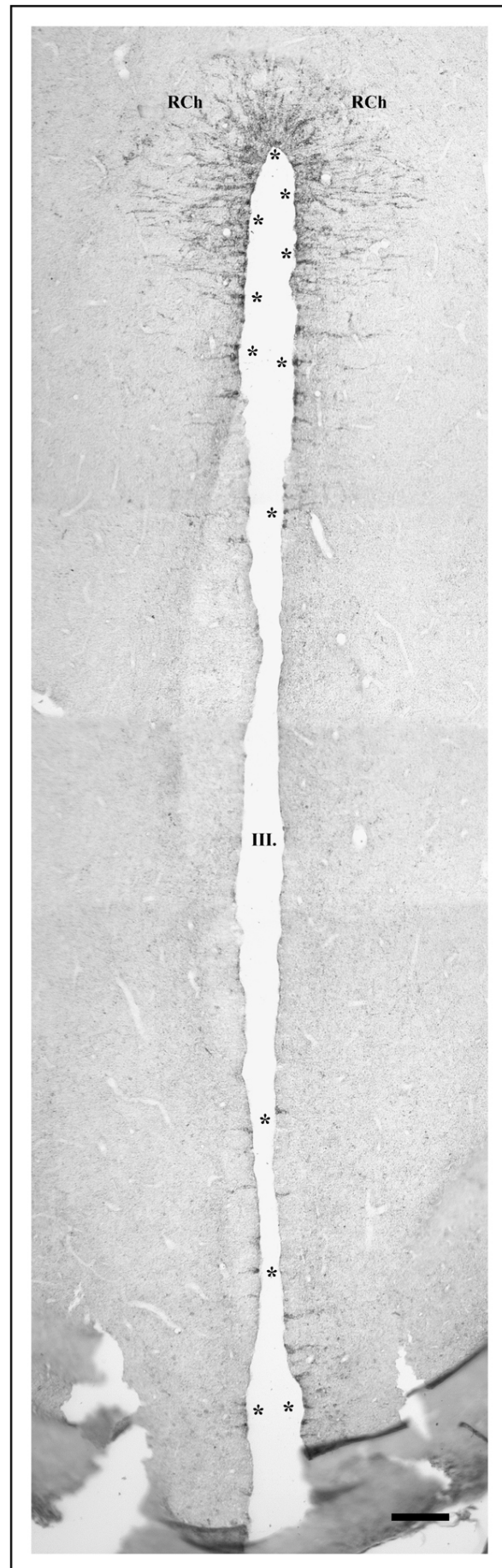


Abb.27: AT₁-IR im Ependym des 3.Ventrikel.
 Bildmontage einer horizontalen Schnittebene demonstriert die Verteilung von AT₁-immunreaktiven Tanyzyten (*) im Ependym des 3.Ventrikel. Der Hauptteil der markierten Tanyzyten liegt im anteroventralen Bereich des 3.Ventrikel und entsendet seine Fortsätze in die retrochiasmatischen Region (RCh). Caudalwärts, bis zur Mitte des Ventrikels, nimmt die Zahl der AT₁-IR Tanyzyten ab und steigt zu seinem caudalen Ende hin wieder an. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 100 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [126].

III.4 Vasopressin-Immunhistologie im PVN, SON und SCN an Paraffinpräparaten von SDR

III.4.1 Vasopressin im *Nucleus paraventricularis*

Der *Nucleus paraventricularis* ist ein von medial nach lateral stark ausgedehntes Kerngebiet, welches bilateral symmetrisch entlang der dorsolateralen Wand des unteren Teils des 3. Ventrikel lokalisiert ist. Seine anterioren und posterioren Anteile reichen von ca. 0.8 mm bis nach 2.0 mm caudal von Bregma²⁶ und seine lateralen Flügel ziehen bis tief in den dorsolateralen Hypothalamus hinein. Sein zentraler Bereich, der hier als PVN bezeichnet wird, ist von einem dichten Gefäßnetz durchzogen [Vergleiche Abb.12A].

Die lichtmikroskopische Betrachtung bei geringer Vergrößerung zeigt, dass viele Neurone, die über weite Teile des PVN verteilt liegen, immunreaktiv gegen den Vasopressinantikörper sind [Abb.28A].

Höher vergrößerte Lichtmikroskopie zeigt, dass der überwiegende Teil der immunreaktiven Neurone in unmittelbarer Nähe von Kapillaren lokalisiert ist oder zumindest über Axone mit diesen in Verbindung steht [Abb.28B]. DAB-Partikel können punktuell an den Zellmembranen lokalisiert werden [Abb.28E]. DAB-Ablagerungen markieren einen Grossteil der Neurone und deren Axone aber auch massiv intrazellulär [Abb.28B].

III.4.2 Vasopressin im *Nucleus supraopticus*

Der *Nucleus supraopticus* ist lateral des *Chiasma opticum* (OC) positioniert. Er zieht als schmaler Schlauch von ca. 0.8 mm caudal von Bregma beginnend etwa 2.2 mm am Rand des OC entlang. Der SON liegt dem OC über weite Strecke direkt an und zwischen seinen Neuronen findet sich ein Geflecht aus Blutgefäßen unterschiedlicher Größe [Vergleiche Abb.12B].

Schon niedrige Lichtmikroskopie demonstriert eine massive Vaso-IR im überwiegenden Teil der Neurone des SON [Abb.28C]. Bei höherer Vergrößerung lässt sich eine deutliche Akkumulation in vielen neuronalen Perikarya des SON erkennen [Abb.28D].

Vaso-IR ist auch in einigen Axonen dieser Neurone lokalisierbar. Die DAB-Markierung ist hierbei kontinuierlich und füllt weite Teile der axonalen Fasern aus [Abb.28D].

²⁶ Bregma und Lambda sind international festgelegte Orientierungspunkte auf dem Dach der Schädelbasis der Ratte.

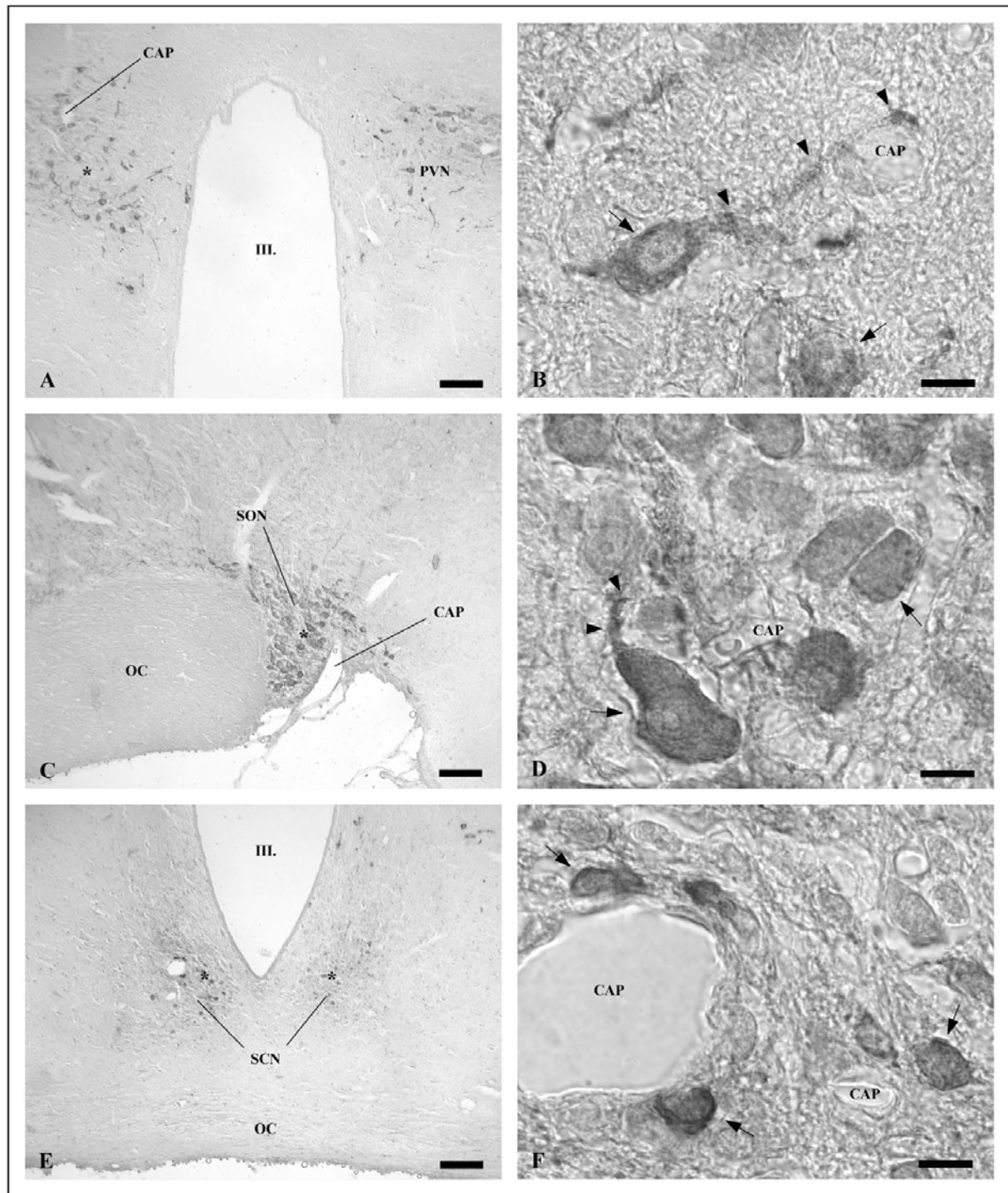


Abb.28: Intrazelluläre Vasopressin-IR in Neuronen von *Nucleus paraventricularis* (PVN), *Nucleus supraopticus* (SON) und *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN).

(A, C und E) Lichtmikroskopische Lokalisation von Vasopressin-IR im PVN, SON und SCN. (B, D und F) Ausschnittsvergrößerungen von (A, C und E). Vasopressin-immunreaktive Neurone sind im PVN und SON über weite Teile beider Kerngebiete verteilt (* in A und C), während die intrazelluläre Vasopressin-IR im SCN überwiegend auf Neurone im medialen Schalenbereich begrenzt ist (* in E). In allen drei hypothalamischen Kerngebieten sind die DAB-Markierungen sowohl an den Zellmembranen, als auch intrazellulär in den Perikarya der Neurone zu identifizieren (schwarze Pfeile in B, D und F). In PVN und SON erscheinen selbst die axonalen Fortsätze der immunreaktiven Neurone durch DAB-Ablagerungen gefärbt (schwarze Pfeilspitzen in B und D), während im SCN nur deren Perikarya markiert sind. Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A, C und E) entsprechen 100 µm. Balken in (B, D und F) entsprechen 10 µm.

III.4.3. Vasopressin im Nucleus suprachiasmaticus

Die lichtmikroskopische Übersicht macht deutlich, dass im *Nucleus suprachiasmaticus*, im Gegensatz zu den flächendeckenden Immunfärbungen in PVN und SON nur wenige Neurone Vaso-IR zeigen. Von DAB-Ablagerungen markierte Neurone lassen sich im SCN nur im medialen Schalenbereich lokalisieren [Abb.28E]. Höhere Vergrößerungen demonstrieren kräftige, intrazelluläre und zellmembranständige DAB-Niederschläge in Neuronen, die in unmittelbarer Nähe zu größeren Gefäßen (>20 µm im Durchmesser) oder Kapillaren liegen [Abb.28F]. Im Vergleich zu den markierten Neuronen von PVN und SON erscheinen die im SCN gefärbten Perikarya klein [Abb.28F]. Großflächige und kontinuierliche DAB-Ablagerungen in axonalen Fasern konnten im SCN nicht identifiziert werden.

III.5 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie im PVN, SON und SCN an Paraffinpräparaten von SDR

III.5.1 AT₁-Rezeptoren im Nucleus paraventricularis und Nucleus supraopticus

Da die ANG II-induzierte Vasopressinproduktion maßgeblich über den ANG II (AT₁)-Rezeptor vermittelt werden soll, lassen sich PVN und SON, wie bei der Vasopressinfärbung, auch bei der AT₁-Rezeptorfärbung gut als Referenzobjekte heranziehen.

Die AT₁-IR in PVN und SON ist quantitativ und qualitativ schwächer als die Vaso-IR der beiden Kerngebieten, d.h. weniger Neurone zeigen starke Immunreaktivität gegen den AT₁-Antikörper [Abb.29A-B und Abb.30A] und die DAB-Reaktionsprodukte füllen die Perikarya nicht zur Gänze aus, sondern verteilen sich vielmehr an deren Zellmembranen [Abb.29C-D und Abb.30B]. Intrazelluläre DAB-Ablagerungen lassen sich nur in wenigen Neuronen des PVN identifizieren [Abb.29C-D].

Sowohl die großen Blutgefäße (> 20 µm), als auch die Kapillargefäße des PVN zeigen über weite Strecken eine AT₁-IR [Abb.29B]. Höhere lichtmikroskopische Vergrößerungen machen DAB-Partikel sowohl in ihren Endothelien, als auch in ihren perivaskulären Regionen sichtbar [Abb.29C-D].

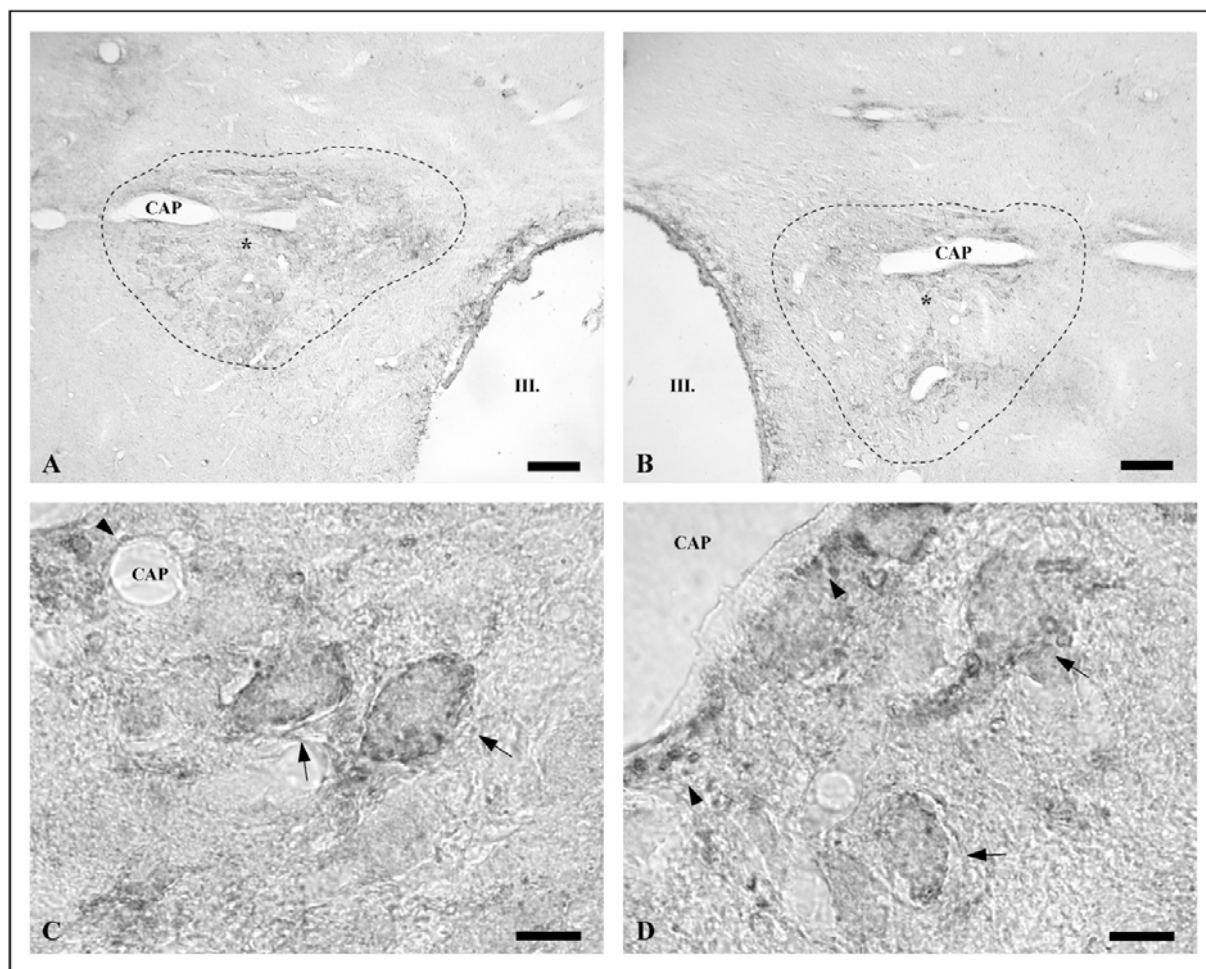


Abb.29:

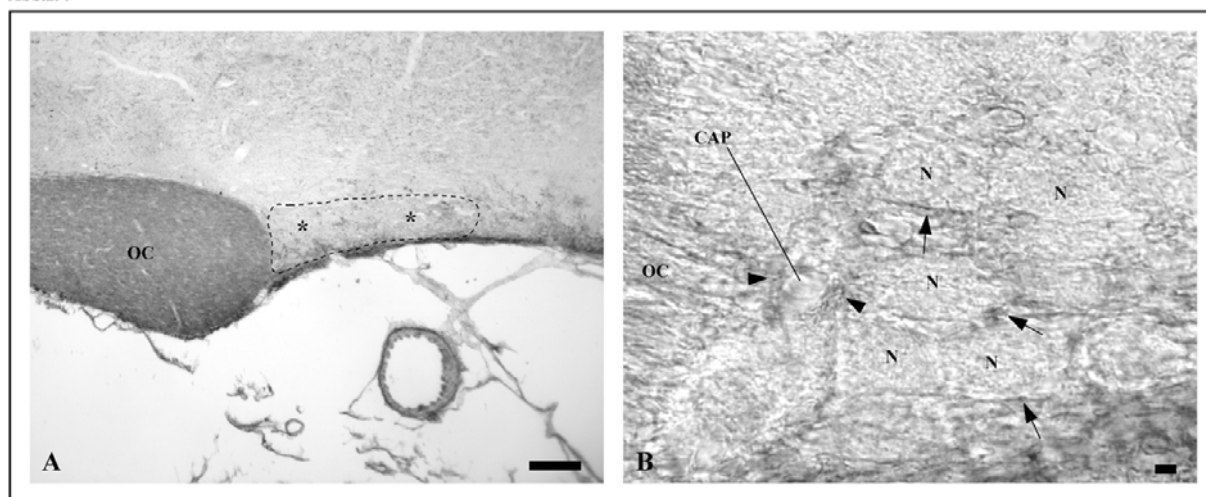


Abb.30:

Abb.29: ANG II-Bindungsstellen im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus.

(A und B) Lichtmikroskopische Lokalisation von AT_1 -IR im PVN. (C und D) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen aus (A und B). Eine diffus über die linke (A) und rechte (B) Seite des PVN verteilte AT_1 -IR (* in A und B) erlaubt dessen Abgrenzung von seiner Umgebung (gestrichelte Linie in A und B). DAB-Reaktionsprodukte markieren vorwiegend die Zellmembranen einzelner Neurone oder intrazelluläre Bereiche in direkter Nähe der Zellgrenzen (schwarze Pfeile in C und D). Die markierten Neurone liegen in relativer Nachbarschaft zu kleineren Kapillaren (schwarze Pfeilspitze in C) und größeren Blutgefäßen (schwarze Pfeilspitze in D), deren Endothelien ebenfalls AT_1 -IR aufweisen. Abkürzungen: wie zuvor. Balken in A und B entsprechen 100 μ m. Balken in C und D entsprechen 10 μ m.

Abb.30: ANG II-Bindungsstellen im *Nucleus supraopticus* des Hypothalamus.

(A) Lichtmikroskopische Lokalisation von AT_1 -IR im SON. (B) Hoch vergrößerte Detailaufnahme aus (A). Die AT_1 -IR (* in A) im SON erstreckt sich als feines Netzwerk über dessen gesamte Fläche (gestrichelte Linie in A). Punktuelle DAB-Ablagerungen sind vorwiegend auf die Zellmembranen einiger Neurone (schwarze Pfeile in B) und die Endothelien von Kapillaren (schwarze Pfeilspitzen in B) begrenzt. Intrazelluläre AT_1 -IR sind nicht zu beobachten. Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A) entspricht 100 μ m. Balken in (B) entspricht 10 μ m.

III.5.2 AT₁-Rezeptoren im *Nucleus suprachiasmaticus*

Im Gegensatz zu der noch klar erkennbaren AT₁-IR in PVN und SON sind DAB-Partikel im SCN von normotensiven SDR - außer an benachbarten, größeren Blutgefäßen (>10 µm im Durchmesser) - auf kleiner bis mittlerer lichtmikroskopischer Ebene nicht auszumachen [Abb.31A und 31C].

Hohe lichtmikroskopische Vergrößerungen zeigen ein feines Netzwerk an DAB-Reaktionsprodukten, die auf eine Markierung von axonalen Terminalen, Dendriten und Gliafortsätzen hindeuten [Abb.31G]. Ausgehend von der anterioren Region des SCN lässt sich dieses Netzwerk feinsten DAB-Ablagerungen bis in sein posteriore Ende verfolgen und ist dabei über die gesamte Breite des Kerns zu identifizieren [Abb.32 und Abb.33]. Anterior lassen nur wenige Neurone des SCN eine DAB-Markierung an ihren Zellmembranen oder/und ihren Perikarya erkennen [Abb.31B und Abb.32]. Zu seinem posterioren Ende hin zeigen mehr Neurone eine schwache intrazelluläre DAB-Färbung. Diese ist von ihrer Intensität jedoch nur als etwas dunklere ‚Hintergrundfärbung‘ vom SCN-Neuropil abzugrenzen [Abb.31G und Abb.33].

Im Gegensatz hierzu ist die AT₁-IR an SCN-Kapillaren oder SCN-nahen Gefäßen bei normotensiven SDR etwas deutlicher ausgeprägt. Viele der kleineren Kapillaren (< 10 µm im Durchmesser) zeigen vereinzelte, nicht kontinuierliche, in hoher lichtmikroskopischen Vergrößerung aber sichtbare DAB-Ablagerungen in ihren Endothelien [Abb.31B und 31G]. Die Endothelien der etwas größeren SCN-nahen Gefäße sind teilweise ebenfalls mit DAB-Partikeln markiert, wobei die DAB-Ablagerungen auch nur sehr lokal begrenzt im Endothel auftreten [Abb.31D-E]. Sehr kräftige DAB-Markierungen finden sich in den perivaskulären Regionen der SCN-nahen, großen Gefäße. Das DAB-Reaktionsprodukt umfasst das Endothel zwar nicht vollständig [Abb.31D-E], liegt dafür aber teils massiv akkumuliert auf periendothelialen Strukturen [Abb.31D und Abb.32].

Abb.31: ANG II-Bindungsstellen im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) normotensiver Sprague-Dawley Ratten (SDR). (A und C) AT₁-IR im SCN bei niedriger lichtmikroskopischer Vergrößerung (Abstand zwischen A und C ca. 100 µm). (B und D) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen aus (A; Rahmen in A). (E und G) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen aus (C; Rahmen in C). (F) Methylenblaufärbung eines coronalen Schnittes durch den Hypothalamus ca. 100 µm caudal von (C) zeigt die annähernd kreisrunde Form des SCN (*) im mittleren Segment seiner anterior/posterioren-Achse. Bei niedriger lichtmikroskopischer Auflösung sind Immunsignale der AT₁-IR nur an Blutgefäßen (schwarze Pfeilspitzen in A und C) im oder in direkter Nachbarschaft des SCN (gestrichelte Linie in A und C) zu identifizieren. Hoch vergrößerte Lichtmikroskopie demonstriert schwache intrazelluläre AT₁-IR an neuronalen Perikarya und Zellmembranen (schwarze Pfeile in B und G). Darüber hinaus ist ein diffus über das SCN-Neuropil verteiltes Netzwerk aus punktuell begrenzten Immunsignalen zu identifizieren (offene Pfeilspitzen in G). Die AT₁-IR in den Endothelien SCN-naher, größerer Gefäße (> 10 µm im Durchmesser) ist lokal begrenzt und schwierig zu identifizieren (schwarze Pfeilspitzen in D und E), während das DAB-Reaktionsprodukt in deren perivaskulären Regionen massiv akkumuliert ist (weiße Pfeile in D und E). In den Endothelien kleinerer SCN-Kapillaren (< 10 µm) sind Immunsignale auf lichtmikroskopischer Ebene wahrnehmbar (schwarze Pfeilspitzen in B und G), aber schwierig von Immunsignalen, die auf periendothelialen Strukturen in der perivaskulären Region liegen (weiße Pfeilspitzen in B und G) zu unterscheiden. Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A, C und F) entsprechen 100 µm. Balken in (B, D, E und G) entsprechen 10 µm. >

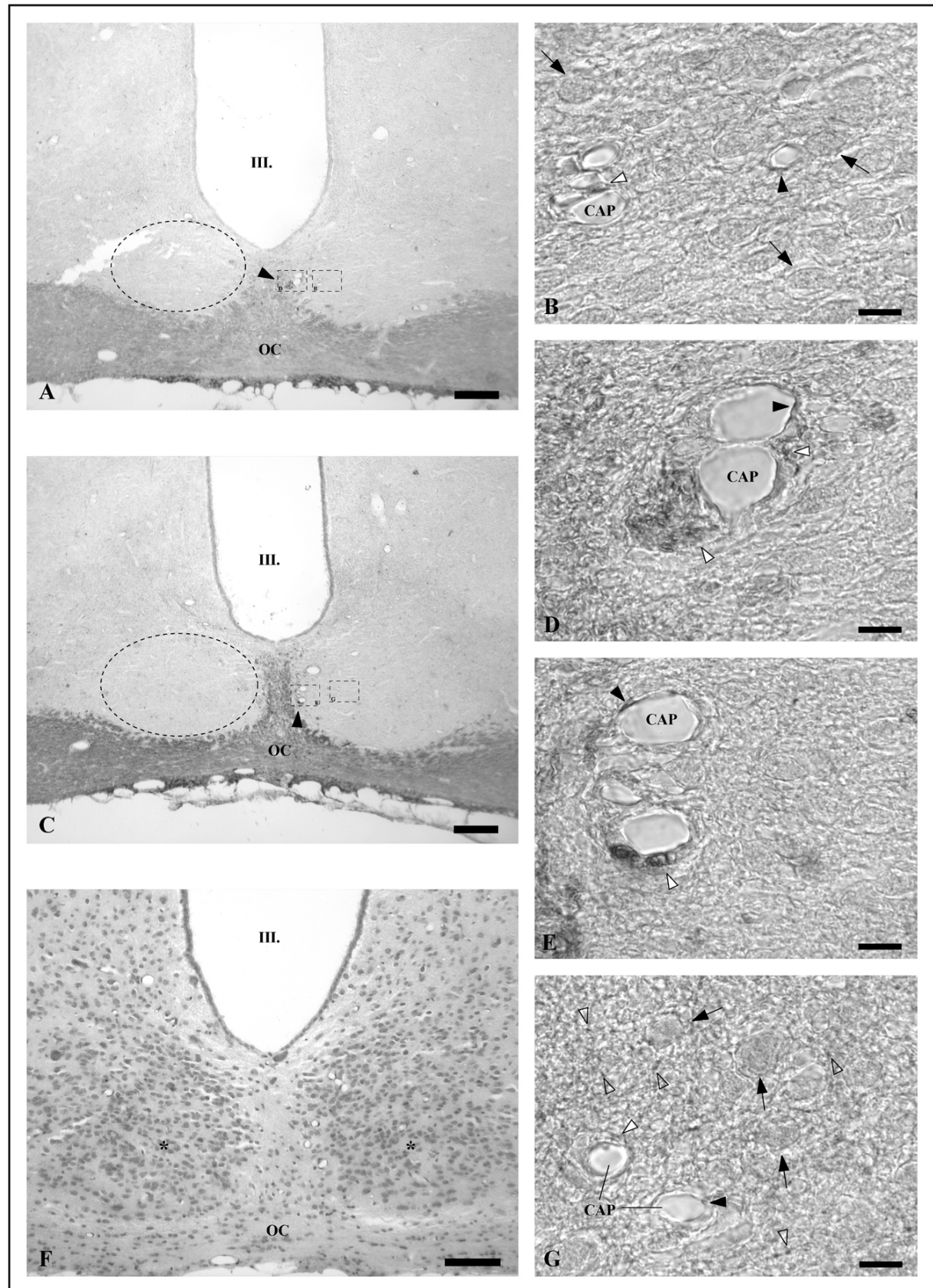


Abb.31:

Abb.32: ANG II-Bindungsstellen im anterioren Teil des *Nucleus suprachiasmaticus* normotensiver SDR. Bildmontage zeigt AT₁-IR in einem coronalen Schnitt durch den anterioren SCN ca. 70 µm rostral von Abbildung 31A. Der SCN ist von abgeflachter ovaler Form (gestrichelte Linie) und zeigt ein Netzwerk schwach ausgeprägter punktueller Immunsignale über seine gesamte Fläche (offene Pfeilspitzen). Wenige, diffus über den SCN verteilte Neurone zeigen eine sehr schwache intrazelluläre AT₁-IR (schwarze Pfeile). Größere Blutgefäße (> 10 µm im Durchmesser) in der näheren Umgebung und in der weiteren Peripherie des SCN weisen ein deutliches Immunsignal in ihren Endothelien (schwarze Pfeilspitzen) und perivaskulären Regionen auf (weiße Pfeilspitzen). Die perivaskulären Regionen der Kapillaren im SCN sind ebenfalls mehrfach - wenngleich auch deutlich schwächer - punktuell von DAB-Ablagerungen markiert (weiße Pfeilspitzen). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 20 µm. >

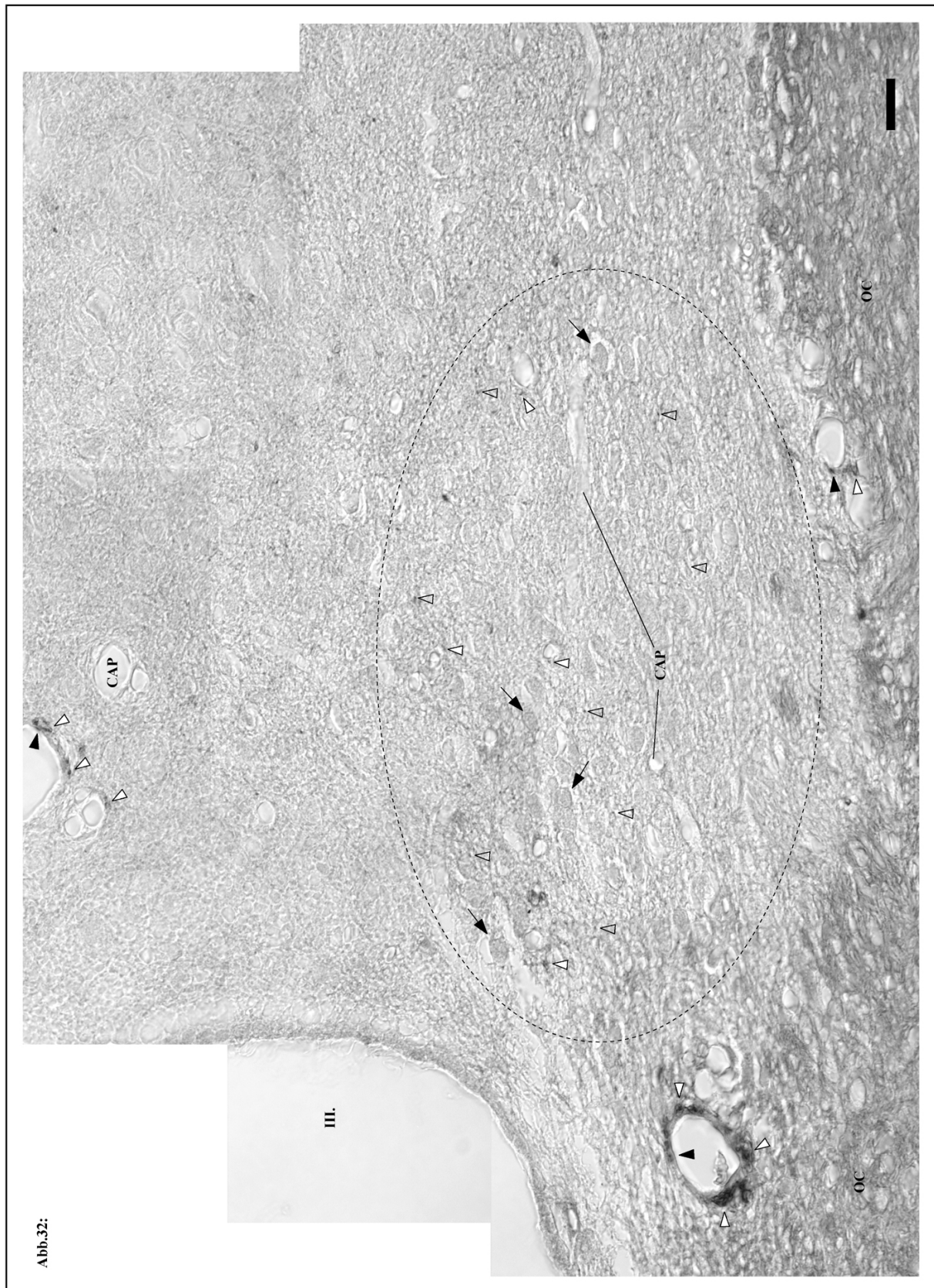


Abb.32:

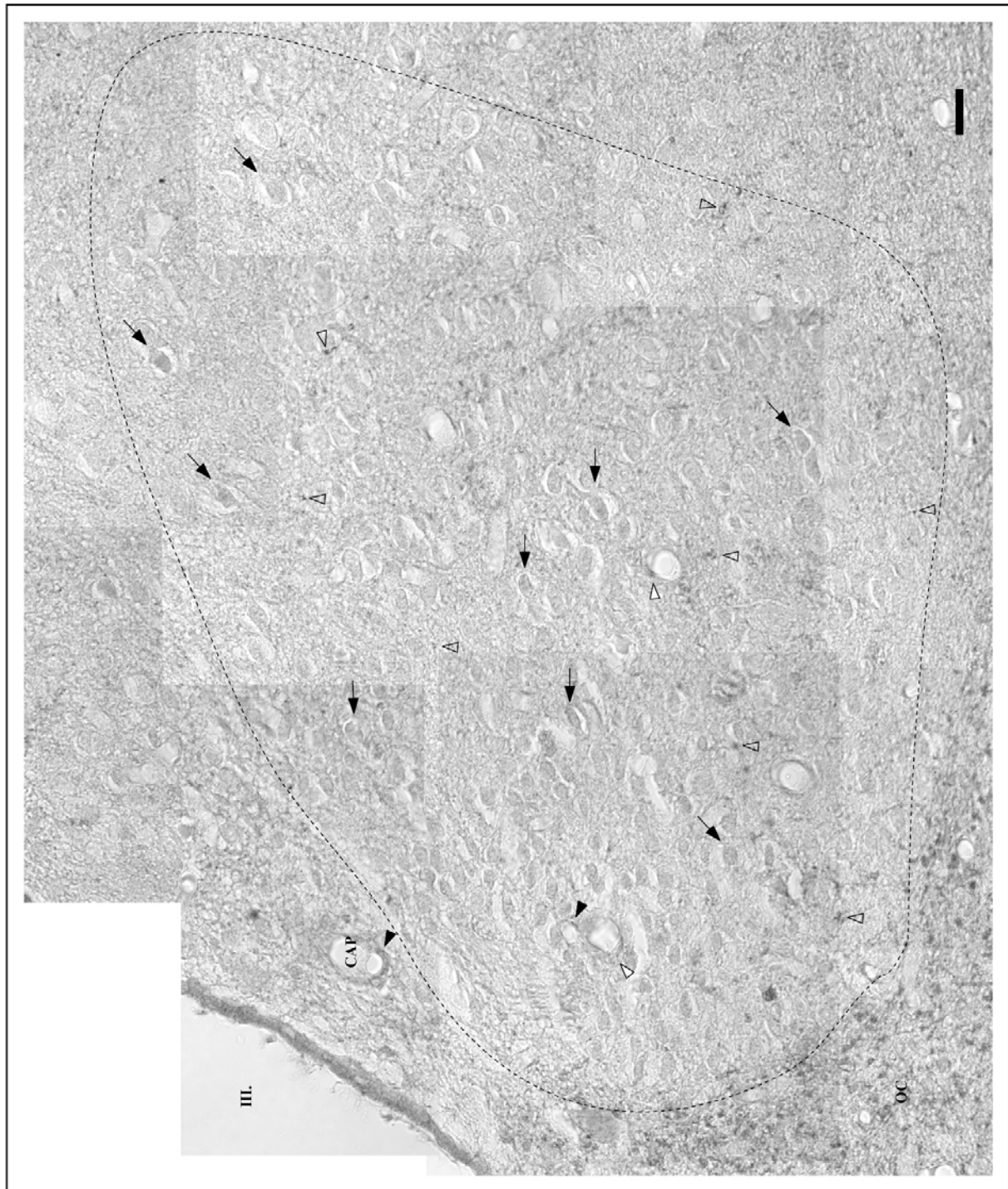


Abb.33: ANG II-Bindungsstellen im posterioren Teil des *Nucleus supraquiasmaticus* normotensiver SDR.

Bildmontage zeigt AT_1 -IR in einem coronalen Schnitt durch den posterioren SCN ca. 100 μm caudal von Abbildung 31F. Der SCN ist von annähernd flügelartiger Form und deutlich nach dorsal gewachsen (gestrichelte Linie). Er zeigt ein Netzwerk schwach ausgeprägter punktueller Immunsignale über seine gesamte Fläche (offene Pfeilspitzen). Zahlreiche, diffus über den SCN verteilte Neurone zeigen eine schwache intrazelluläre AT_1 -IR (schwarze Pfeile). Kapillar- und Gefäßendothelien in und außerhalb des SCN sind schwach von DAB-Ablagerungen markiert (schwarze Pfeilspitzen). DAB-Reaktionsprodukte sind ebenfalls in den perivaskulären Regionen von SCN-Blutgefäßen wahrzunehmen (weiße Pfeilspitzen). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 20 μm .

III.6 ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie im SCN an Paraffinpräparaten von TGR

AT₁-IR ist im SCN von transgen-hypertensiven TGR, ähnlich der Immunreaktion der SDR - außer an größeren, dem SCN benachbarten Blutgefäßen (> 10 µm im Durchmesser) - bei schwächerer lichtmikroskopischer Vergrößerung nicht zu lokalisieren [Abb.34C und 34F]. Diese stärkeren Immunreaktionen treten bei TGR allerdings seltener auf als bei SDR und sind von der Verteilung und Intensität der DAB-Ablagerungen deutlich weniger massiv [Abb.34C].

Hohe lichtmikroskopische Vergrößerungen zeigen auch bei TGR ein feines Netzwerk an DAB-Reaktionsprodukten, die auf eine Markierung an Terminalen, Dendriten und Gliafortsätzen schließen lässt. Ausgehend vom anterioren Beginn des SCN lässt sich dieses Netzwerk bis in seine posterioren Bereiche über die gesamte Fläche des Kerns ausmachen [Abb.34B und 34G].

Wie bei SDR beobachtet, lassen im anterioren Abschnitt des SCN nur wenige Neurone intrazelluläre DAB-Markierung erkennen [Abb.34B und 34D]. Zum posterioren Ende hin steigt mit zunehmender Größe des Kerns ihre Zahl jedoch ebenfalls an [34E und 34G].

Kapillaren im SCN von transgen-hypertensiven TGR zeigen, ähnlich ihren normotensiven Gegenstücken, nur einen geringen DAB-Niederschlag in ihren Endothelien [Abb.34B und 34E]. In ihren perivaskulären Regionen lässt sich das DAB-Reaktionsprodukt ebenfalls nur in Form von lokal sehr begrenzten Ablagerungen ausmachen [Abb.34B und 34G]. Große Gefäße in der Peripherie des SCN oder in dessen unmittelbarer Nähe weisen bei TGR - auch bei höherer lichtmikroskopischer Vergrößerung - kaum sichtbare DAB-Ablagerungen in ihren Endothelien auf [Abb.34D]. In ihren perivaskulären Regionen lassen sich allerdings kräftige, wenn gleich auch lokal sehr begrenzte DAB-Niederschläge auf periendothelialen Strukturen nachweisen [Abb.34D].

Abb.34: ANG II-Bindungsstellen im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) transgen-hypertensiver TGR(mREN2)27 Ratten (TGR). (A) Methylenblaufärbung eines coronalen Schnittes durch den Hypothalamus ca. 30 µm rostral von (C) zeigt die annähernd ovale Form des SCN (*) im vorderen Segment seiner anterior/posterioren-Achse. (C und F) AT₁-IR im SCN bei niedriger lichtmikroskopischer Vergrößerung (Abstand zwischen C und F ca. 120 µm). (B und D) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen aus (C; Rahmen in C). (E und G) Hoch vergrößerte Detailaufnahmen aus (F; Rahmen in F). Bei niedriger lichtmikroskopischer Auflösung sind Immunsignale der AT₁-IR nur an Blutgefäßen (> 10 µm im Durchmesser) (schwarze Pfeilspitze in C) im oder in direkter Nachbarschaft des SCN (gestrichelte Linie in C und F) zu identifizieren. Hoch vergrößerte Lichtmikroskopie demonstriert schwache intrazelluläre AT₁-IR an neuronalen Perikarya und Zellmembranen (schwarze Pfeile in B,D, E und G). Darüber hinaus ist ein diffus über das SCN-Neuropil verteiltes Netzwerk aus punktuell begrenzten Immunsignalen zu identifizieren (offene Pfeilspitzen in B und G). Die AT₁-IR in den perivaskulären Regionen von SCN-nahen, größeren Gefäßen ist deutlich sichtbar (weiße Pfeilspitzen in D). Immunreaktivität im Endothel dieser größeren Blutgefäße ist nicht wahrnehmbar (D). Das Immunsignal im Endothel kleinerer Kapillaren im SCN ist auf hoher lichtmikroskopischer Ebene wahrnehmbar (schwarze Pfeilspitzen in B, E und G), aber nur schwer von den DAB-Ablagerungen auf periendothelialen Strukturen in den perivaskulären Regionen abzugrenzen (weiße Pfeilspitzen in B, E und G). Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A, C und F) entsprechen 100 µm. Balken in (B, D, E und G) entsprechen 10 µm. >

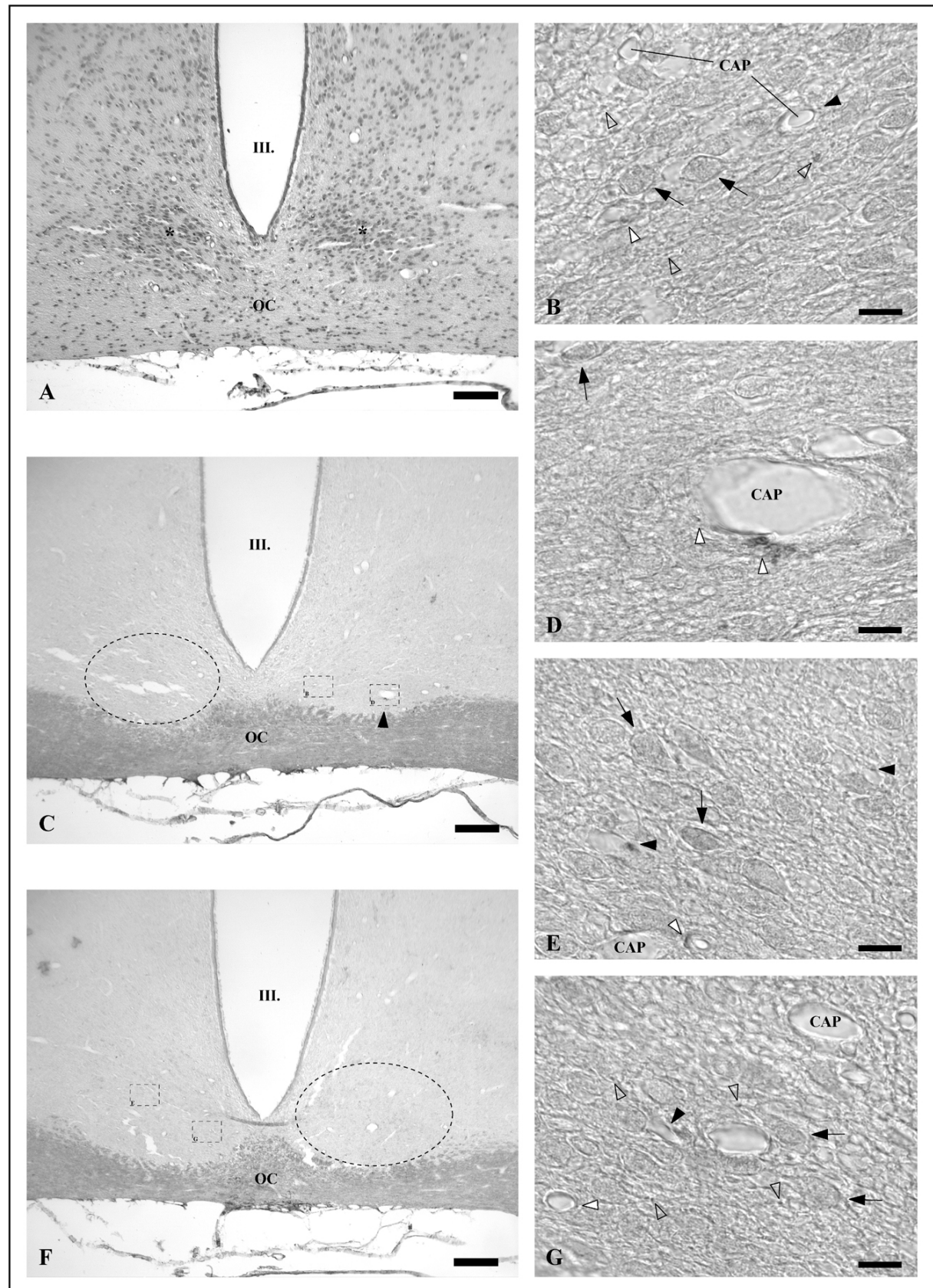


Abb.34:

III.7 ANG I/II- und ANG II (AT₁)-Rezeptor-Immunhistologie im SCN an Kunstharzpräparaten von SDR

III.7.1 ANG II-Bindungsstellen im SCN

Die Untersuchungen an Semidünnschnittpräparaten des SCN normotensiver Ratten bestätigen die lichtmikroskopischen Beobachtungen an 10 µm dicken Paraffinpräparaten. Die Betrachtung der Semidünnschnitte zeigt ein über den SCN verzweigtes Netzwerk an punktförmigen, kleinen DAB-Niederschlägen [Abb.35A]. Im Vergleich zu den Paraffinschnitten ermöglicht die höher vergrößerte Lichtmikroskopie an den nur 1 µm dünnen Kunstharzschnitten eine bessere Identifizierung der punktuellen DAB-Ablagerungen im SCN. DAB-Niederschläge markieren Strukturen in der perivaskulären Region von Kapillaren, liegen vereinzelt an den Zellmembranen von Perikarya und Endothelzellen und erscheinen willkürlich im Neuropil des SCN verteilt [Abb.35B-C]. Die Feinheit der DAB-Niederschläge im SCN-Neuropil deutet auf eine Ablagerung an axonalen Terminalen, Dendriten und Gliafortsätzen hin.

Abb.35: Lokalisation von ANG II-Bindungsstellen im SCN von normotensiven Sprague-Dawley Ratten (SDR) an Semidünnschnitten mit DAB-Färbung.

(A) Übersichtsaufnahme der AT₁-IR in einem coronalen Semidünnschnitt (1 µm Schnittdicke) durch den posterioren SCN (gestrichelte Linie) einer normotensiven Sprague-Dawley Ratte. (B und C) Ausschnittsvergrößerungen von (A; Rahmen in A). Ein Netzwerk kleiner DAB-Partikel überzieht das SCN-Neuropil wie ein dunkler Schleier. Viele Kapillaren (< 10 µm im Durchmesser) durchziehen den SCN, während größere Gefäße (> 10 µm im Durchmesser) ihn in seiner Peripherie flankieren. SCN-Neurone sind anhand ihrer hellen, meist ovalen Zellkernen gut im SCN-Neuropil zu identifizieren (*). Nur wenige Zellkerne bzw. Perikarya zeigen eine deutliche DAB-Markierung an ihren Zellmembranen (schwarze Pfeile in A-C). Hohe lichtmikroskopische Vergrößerung demonstriert kleinere und größere punktuelle Ablagerungen der DAB-Partikel im Neuropil des SCN (offene Pfeilspitzen in B-C). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 10 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

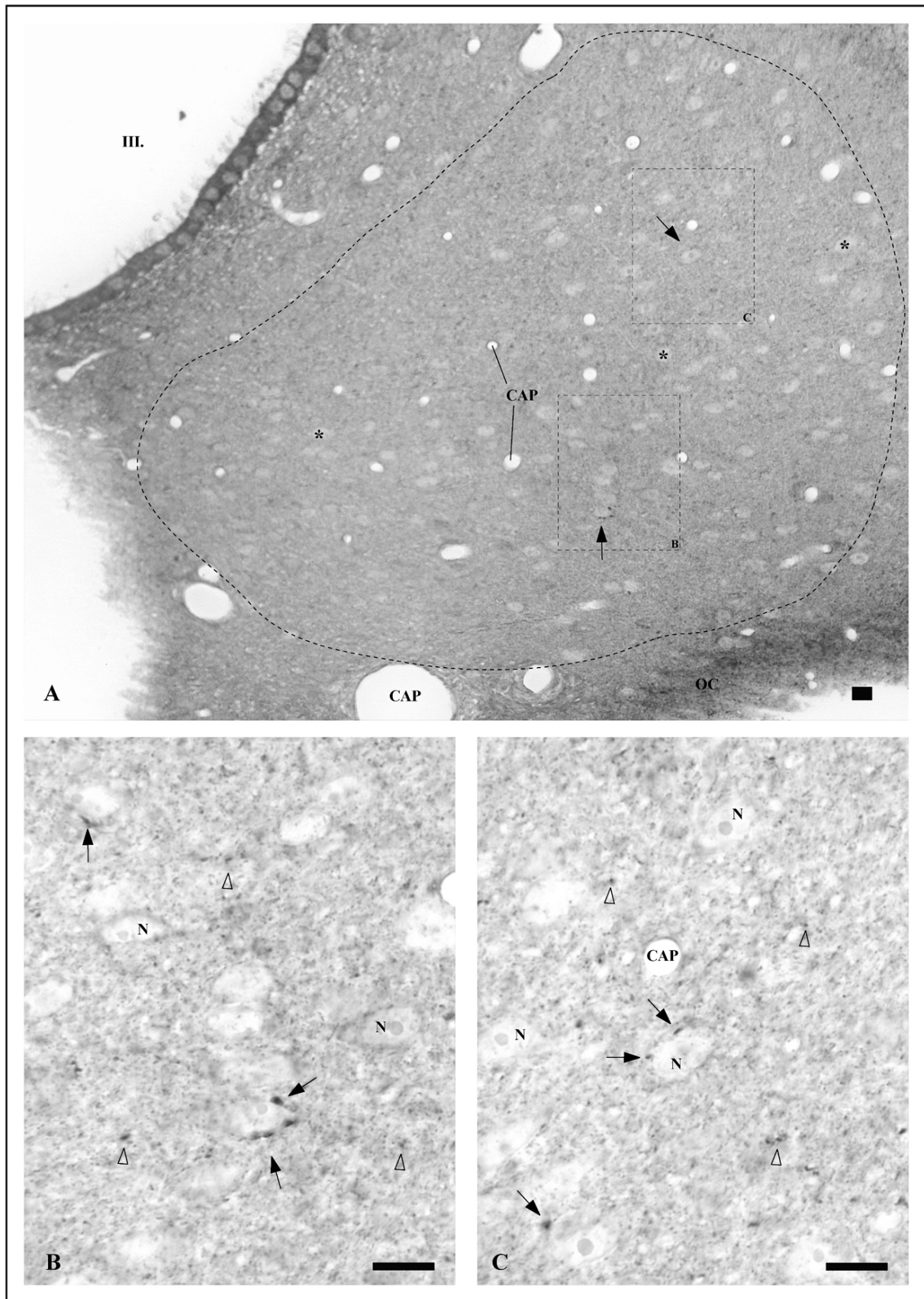


Abb.35:

III.7.2 ANG I/II-Immunreaktivität im SCN

Beobachtungen an Semidünnschnitten auf kleiner lichtmikroskopischer Ebene zeigen eine klar identifizierbare ANG I/II-IR an zahlreichen Neuronen und Kapillaren ($< 10 \mu\text{m}$ im Durchmesser) des SCN [Abb.36A]. Im Gegensatz zur AT_1 -IR erscheint die ANG I/II-IR in diesen Neuronen punktuell konzentriert [Abb.36B]. Höhere lichtmikroskopische Vergrößerung demonstriert ein starkes Immunsignal in den Zellkernen der markierten Neurone sowie eine eindeutige DAB-Färbung in und an Endothelien verschiedener Blutgefäße innerhalb des SCN [Abb.37A-B].

Neben dieser lokalen Akkumulation von ANG I/II-IR in Zellkernen und an Gefäßen zeigen die lichtmikroskopischen Untersuchungen ein dichtes Netz punktförmiger, kleiner DAB-Ablagerungen, die über das gesamte Neuropil des SCN verteilt sind [Abb.37A-B]. Diese Markierungen durch den ANG I/II-Antikörper sind vermutlich - ähnlich der AT_1 -IR - an axonalen Terminalen, Dendriten und Gliafortsätzen lokalisiert.

Größere Gefäße ($> 20 \mu\text{m}$ im Durchmesser) in unmittelbarer Nähe des SCN weisen eine massive Akkumulation von DAB-Partikeln auf [Abb.36A-B und Abb.38A-B]. Eine nähere Betrachtung demonstriert starke DAB-Niederschläge in den perivaskulären Regionen dieser Gefäße sowie eine geringere Immunreaktivität in den Endothelien [Abb.38A-B].

Abseits des SCN, lassen sich darüber hinaus ANG I/II-immunreaktive Fasern im *Chiasma opticum* lokalisieren, deren Immunfärbung sich bis zu Zellen in der ventralen Peripherie des SCN verfolgen lässt [Abb.36B].

Die lichtmikroskopischen Befunde zeigen, dass eine sichere Lokalisation der AT_1 -Rezeptor- und ANG I/II-Immunsignale sowie eine nähere Identifizierung der immunreaktiven Strukturen einer weiterführenden elektronenmikroskopischen Beobachtung bedarf.

Abb.36: Lokalisation von ANG I/II im SCN von normotensiven SDR an Semidünnschnitten mit DAB-Färbung.

(A) Übersichtsaufnahme über die ANG I/II-IR in einem Semidünnschnitt ($1 \mu\text{m}$ Schnittstärke) durch den anterioren SCN einer normotensiven SDR (gestrichelte Linie in A). (B) Ausschnittsvergrößerung von (A). ANG I/II-IR ist selbst bei niedriger und mittlerer lichtmikroskopischer Vergrößerung an den Endothelien großer SCN-naher Blutgefäße ($20\text{-}50 \mu\text{m}$ im Durchmesser) zu erkennen (schwarze Pfeilspitzen in A und B). Kleinere Gefäße ($< 10 \mu\text{m}$ im Durchmesser) - vermutlich Kapillaren - im SCN zeigen ebenfalls deutliche Immunsignale an ihren Endothelien (kleine, schwarze Pfeilspitzen in B). Im SCN-Neuropil liegen einige deutlich vom DAB-Reaktionsprodukt dunkel gefärbte Zellkerne (schwarze Pfeile in B). Im *Chiasma opticum* sind ANG I/II-immunreaktive Fasern zu identifizieren (offene Pfeilspitzen in B). Diese ziehen von oder zu immunreaktiven Zellen in der unteren Peripherie des SCN (offener Pfeil in B). Rahmen in (B) zeigen Regionen, welche in den Abbildungen 37 und 38 als Detailaufnahmen dargestellt sind. Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A) entspricht $100 \mu\text{m}$. Balken in (B) entspricht $10 \mu\text{m}$. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

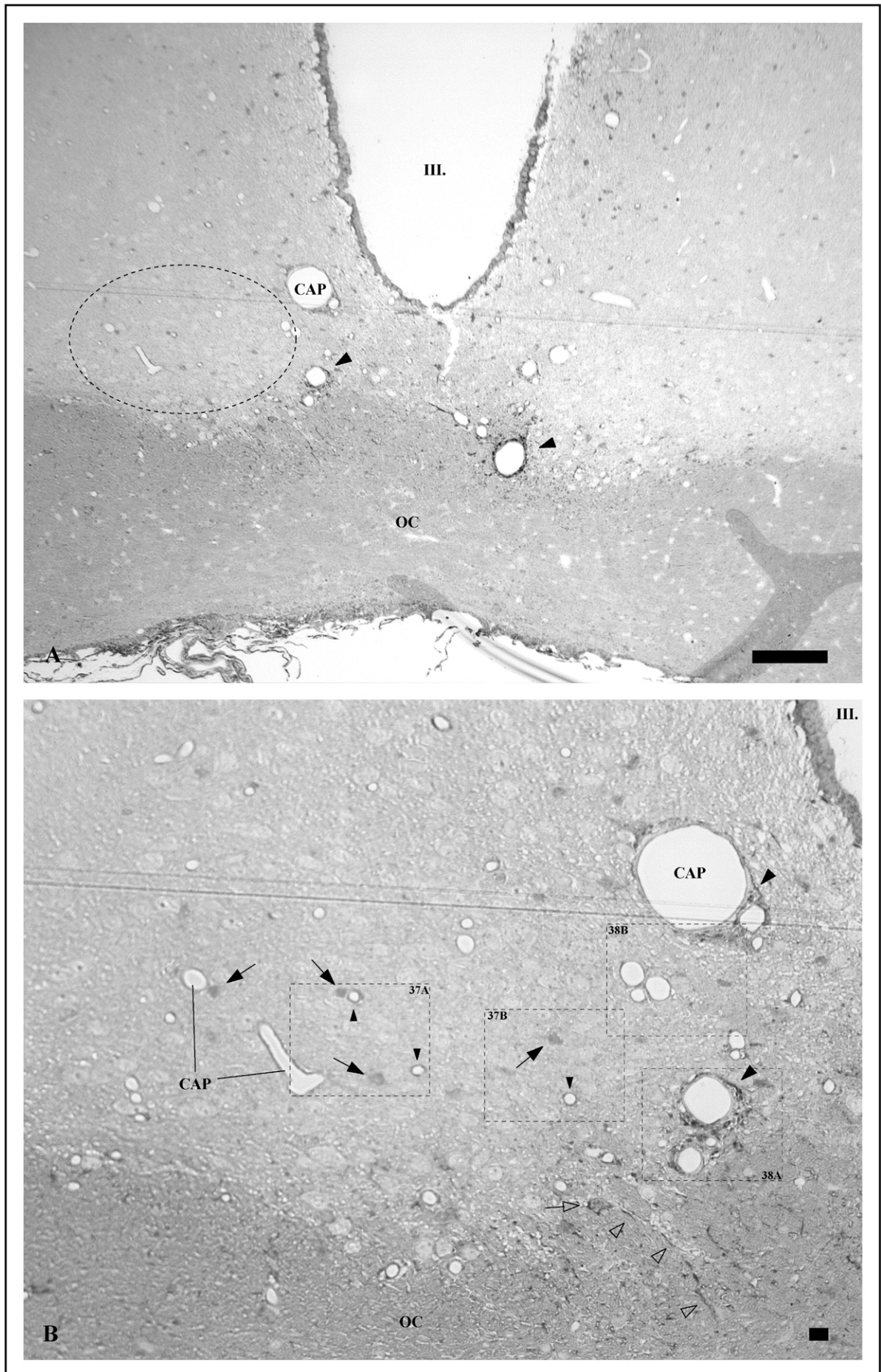


Abb.36:

Abb.37: Lokalisation von ANG I/II in Neuronen und Kapillaren im SCN von normotensiven SDR.
(A und B) Ausschnittsvergrößerungen zeigen Detailaufnahmen der Abbildung 36B. Eine massive Akkumulation von DAB-Ablagerungen ist in neuronalen Zellkerne im SCN zu erkennen (schwarze Pfeile in A und B). Darüber hinaus weisen SCN-Kapillaren eine starke ANG I/II-IR in ihren Endothelien auf (schwarze Pfeilspitzen in A und B). Weiterer DAB-Niederschlag ist diffus über das SCN-Neuropil verteilt (offene Pfeilspitzen in A und B). Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A und B) entsprechen 10 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

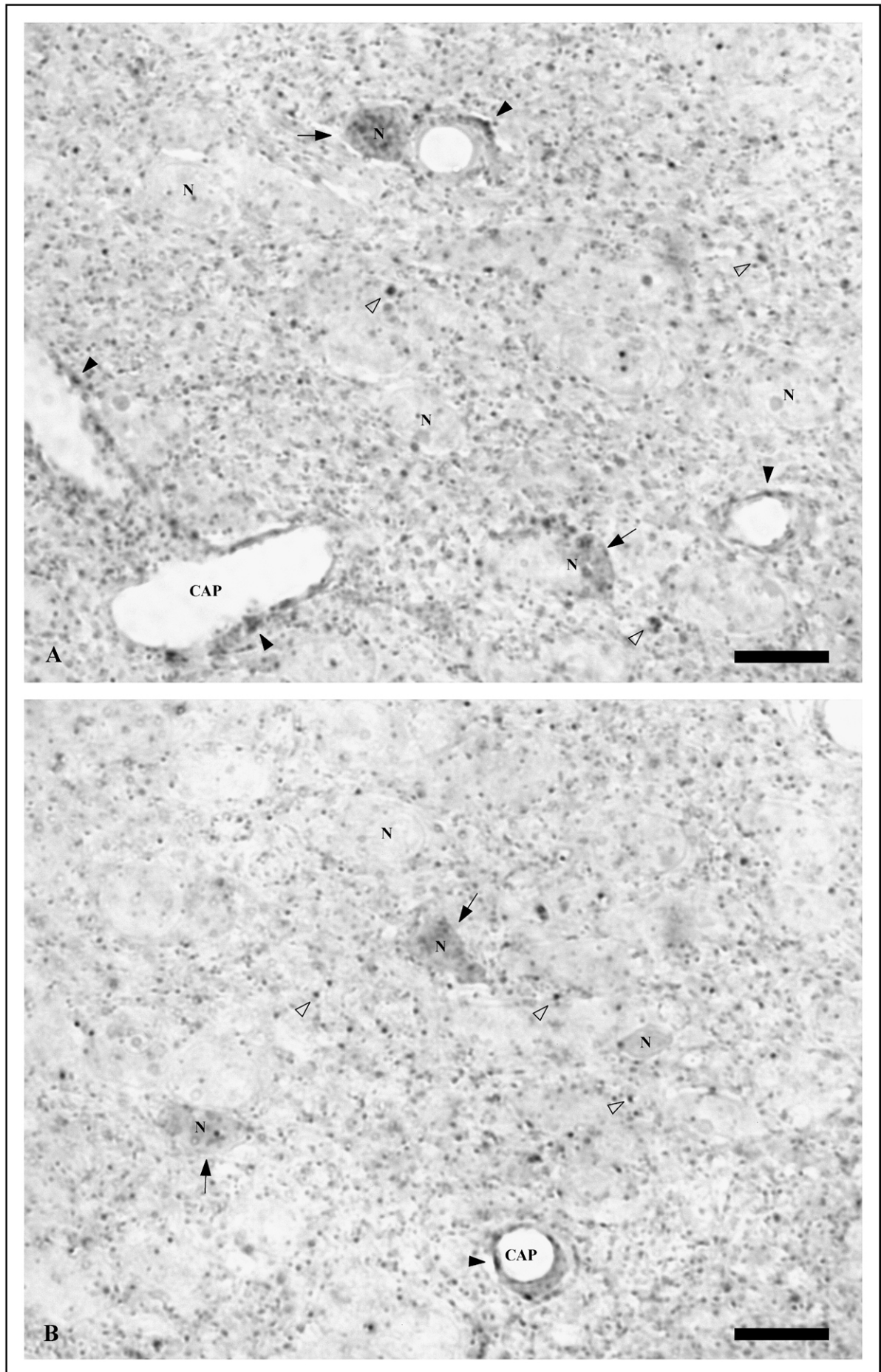


Abb.37:

Abb.38: ANG I/II in Endothelien und perivaskulären Regionen SCN-naher Blutgefäße in normotensiven SDR. (A und B) Ausschnittsvergrößerungen zeigen Detailaufnahmen der Abbildung 36B. SCN-nahe Blutgefäße von unterschiedlicher Größe (6-20 µm im Durchmesser), weisen eine ANG I/II-IR in ihren Endothelien auf (schwarze Pfeilspitzen in A und B). Darüber hinaus zeigt die höher vergrößerte Lichtmikroskopie eine massive Akkumulation von DAB-Ablagerungen in der perivaskulären Region dieser Gefäße (weiße Pfeilspitzen in A und B). Eine Akkumulation von DAB-Partikeln ist auch in einigen Zellkernen abseits des SCN-Neuropils sichtbar (schwarze Pfeile in A und B). Abkürzungen: wie zuvor; N_E, Nucleus der Endothelzelle . Balken in (A und B) entsprechen 10 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

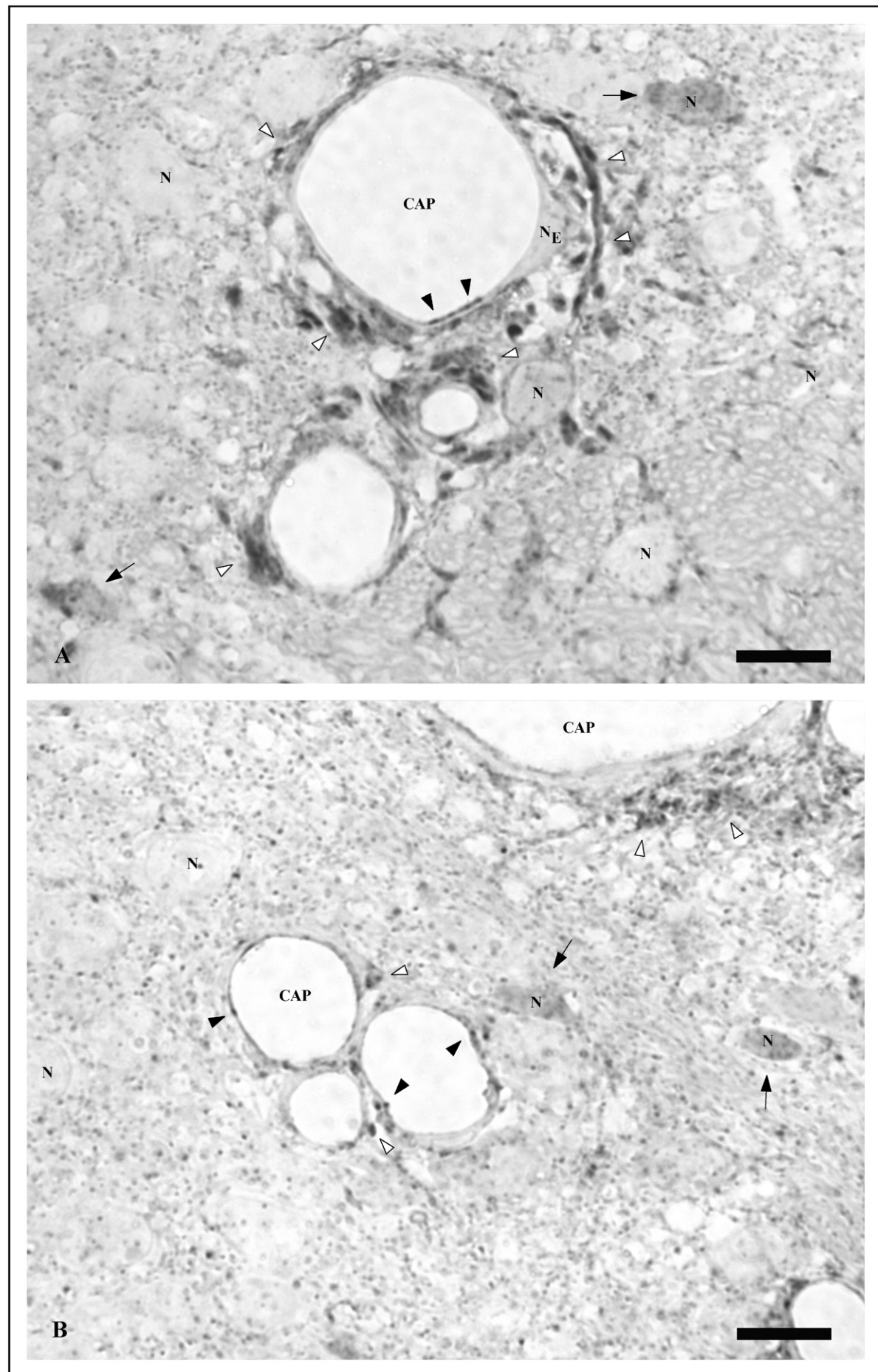


Abb.38:

III.8 Dichte und Verteilung der AT₁-Rezeptoren in den untersuchten Gehirnarealen von SDR und TGR im Überblick

Neben den hier im Detail vorgestellten Befunden zur Lokalisation von AT₁-IR an zwei Zirkumventrikularorganen, dem *Plexus choroideus* sowie den lateralen Ventrikeln und dem *Nucleus suprachiasmaticus* von normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten, wurden in dem bearbeiteten Hirnareal auch noch die den lateralen Ventrikeln benachbarten Gebiete einer kurzen Inspektion ihrer AT₁-IR unterzogen. Hier schwankt die Stärke der AT₁-IR und zeigt keine einheitliche Präferenz zu SDR oder TGR [siehe Tabelle 1]. So zeigt das Ependym der lateralen Ventrikel an vielen Positionen bei allen SDR zwar eine intensivere und dichtere Markierung, als bei allen untersuchten TGR, in der Grenzregion zum *Caudatum putanem* weisen alle TGR allerdings Immunmarkierungen auf, die bei SDR völlig fehlen [siehe Abb.21A-B]. Unterschiede gelten auch für die AT₁-IR im *Nucleus septalis lateralis* (dorsaler Teil; LSD). Hier ist die AT₁-IR bei allen untersuchten SDR zwar lokal intensiver, d.h. stärker in einzelnen Zellen, in ihrer gesamten Flächenausdehnung jedoch deutlich geringer als bei allen TGR [siehe Abb.21A-B]. Darüber hinaus zeigt die Verbreitung von immunreaktiven Kapillaren zwischen dem *Cingulum* und dem *Corpus callosum* bei TGR eine deutlich größere Flächenausdehnung als bei SDR [siehe Abb.21A-B].

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zur Lokalisation der AT₁-IR in beiden Rattenstämmen zusammen und gibt einen Überblick über die bereits gezeigten Befunde.

TABELLE 1: FÄRBEINTENSITÄT, DICHTE UND VERTEILUNG DER AT₁-IR IN VERSCHIEDENEN REGIONEN VON KERNGEBIETEN DER AV3V, DER LATERALEN VENTRIKEL UND DES HYPOTHALAMUS

Lokalisation der AT ₁ -IR	SDR	TGR	Abb [#]
OvLT (Parenchym, zentraler Teil)	++	++	13/14
OvLT (Parenchym, laterale Teile)	++	++	13
OvLT (Parenchym, laterale Ausläufer)	++	++	13
OvLT (Endothel der muskulären Arteriolen)	°	-	16
OvLT (Endothel der nichtmuskulären Gefäße)	°	-	16
OvLT (perivaskuläre Region der muskulären Arteriolen)	+	-	16
OvLT (perivaskuläre Region der nichtmuskulären Gefäße)	+	+	16
SFO (Parenchym, Übergangsregion)	+	°	17/18
SFO (Parenchym, Caudale Region)	°	°	17/18
SFO (Endothel der Blutgefäße, Übergangsregion)	°	°	18
SFO (Endothel der Blutgefäße, Caudale Region)	°	-	18
SFO (perivask. Region der Blutgefäße, ÜbergangsRegion)	+	°	18
SFO (perivask. Region der Blutgefäße, Caudale Region)	++ ²	++	18
ChP (Ependym)	++	+	21/22
ChP (Endothel)	°	°	22
ChP (perivaskuläre Regionen)	+	+	22
Ependym und ‚Horn‘ (laterale Ventrikel)	++ ¹	++ ²	23/24
Nucleus septalis lateralis (LSD)	++ ¹	++ ²	21
Kapillaren zwischen <i>Cingulum</i> und <i>Corpus callosum</i>	+	+ ²	21
<i>Caudatum putanem</i>	-	+	21
SCN (Neuropil)	°	°	31/34
SCN (Endothel kleinerer Blutgefäße & Kapillaren)	°	°	31/34
SCN (peri. Regionen kleinerer Blutgefäße & Kapillaren)	°	°	31/34
SCN-nahe Blutgefäße (Endothel)	+	°	31/34
SCN-nahe Blutgefäße (perivaskuläre Region)	++	+	31/34

++ = sehr starke Immunreaktion. Lichtmikroskopisch leicht wahrnehmbar. Intensiv, hohe Dichte mit ausgedehnter Fläche.

+ = starke Immunreaktion. Lichtmikroskopisch wahrnehmbar. Intensiv oder hoher Dichte.

° = schwache Immunreaktion. Nur in hoher Lichtmikroskopie sichtbar. Wenig intensiv, keine hohe Dichte, nicht flächendeckend.

- = keine erkennbare Immunreaktion.

¹ = vereinzelt auf lokalen Strukturen intensiver als bei transgen-hypertensiven TGR.² = die immunreaktive Fläche ist insgesamt größer als bei normotensiven SDR.

IV. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE

Bevor die immunhistologischen Untersuchungen am SCN auf elektronenmikroskopischer Ebene erfolgen konnten, war es nötig sich einen generellen Überblick über das Erscheinungsbild der AT₁- und ANG I/II-IR in Neuronen, Glia- und Endothelzellen auf ultrastruktureller Ebene zu verschaffen. Nach einer lichtmikroskopischen Interpretation wurden hierzu während der Erprobungsphase der Technik das Ependym des 3.Ventrikels, die Endothelien von Kapillaren sowie die perivaskulären Regionen normotensiver Wistar Ratten auf ihre AT₁- und ANG I/II-IR hin untersucht²⁷.

Die hier im Anschluss beschriebenen Ergebnisse an Kapillaren und Gliaelementen entstammen der Region zwischen dem *Nucleus paraventricularis* (PVN) und dem Ependym des 3.Ventrikels [siehe Abb.12A] und dienen als Orientierungs- und Interpretationshilfe für die gezeigten ultrastrukturellen Befunde zur AT₁- und ANG I/II-IR am SCN von Sprague-Dawley Ratten.

IV.1 ANG II (AT₁)-Rezeptor- und ANG I/II-IR in Kapillaren des dorsalen Hypothalamus

IV.1.1 AT₁-Rezeptoren im Kapillarendothel

Die untersuchten Blutgefäße sind Teil einer funktionellen Blut-Hirn-Schranke, d.h. die endothelialen Zellmembranen liegen in engen Kontakt und bilden *Zonulae occludentes*. Kleinere Gefäße (ca. 5 µm im Durchmesser) sind zudem oftmals von Perizyten umgeben.

Querschnitte von Kapillaren zeigen eine deutliche AT₁-IR im Endothel [Abb.39A]. DAB-Partikel sind direkt an der luminalen und der abluminalen endothelialen Zellmembran lokalisiert [Abb.39C und 39D]. Weitere DAB-Reaktionsprodukte finden sich im Zytoplasma des Endothels. Hier liegen sie an Vesikeln und membrangebundenen Organellen [Abb.39D und 40A].

²⁷ Veröffentlicht in M.A. Thomas, G. Fleissner, S. Hauptfleisch and B. Lemmer, Subcellular identification of angiotensin I/II- and angiotensin II (AT₁)-receptor-immunoreactivity in the central nervous system of rats, Brain Res. 962 (2003) 92-104.

Abb.39: AT₁-Rezeptoren im Endothel und der perivaskulären Region von Kapillaren im Hypothalamus.

(A und B) Unkontrastierte Ultradünnschnitte zeigen Kapillaren (ca. 5 µm im Durchmesser) umgeben von Perizyten. (C und D) Höher vergrößerte Details aus (A). Das Endothel ist teilweise durch DAB-Partikel gefärbt (schwarze Pfeilspitzen in C und D). In der perivaskulären Region liegt die DAB-Markierung an periendothelialen Zelle - vermutlich Gliakomponenten (weiße Pfeilspitzen in B und C). Abkürzungen: Ax, Axon; CAP, Gefäßlumen; ec, Endothelzelle; L, Lysosom; N_E, Nucleus der Endothelzelle; Pp, Perizytenfortsatz. Balken entsprechen 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

>

Abb.40: AT₁-Rezeptoren an nervösen Terminalen in der perivaskulären Region.

(A) Unkontrastierter Ultradünnschnitt zeigt eine Kapillare (ca. 5 µm im Durchmesser) umgeben von Perizytenfortsätzen. (B) Höher vergrößertes Detail von (A; Rahmen in A) mit axonalen Terminalen nahe der Kapillare. Das DAB-Reaktionsprodukt ist an den Zellmembranen und im Zytoplasma des Gefäßes (schwarze Pfeilspitzen in A) und in neuronalen Strukturen in der perivaskulären Region zu identifizieren (weiße Pfeile in A). Höhere Vergrößerungen demonstrieren DAB-Ablagerungen an Vesikeln und an Zellmembranen von Terminalen (weiße Pfeile in B). (C und D) Gleiche Ausschnitte wie (B) aus zwei benachbarten Ultradünnschnitten. Zur Identifizierung ultrastruktureller Details wurden die Schnitte mit Uranylazetat (C) und Uranylazetat und Bleizitrat (D) kontrastiert. Die Kontrastverstärkung erlaubt keine sichere Abgrenzung des Immunsignals von der ultrastrukturellen Umgebung (gestrichelte Pfeile in C und D). Abkürzungen: wie zuvor; ECM, extrazelluläre Matrix; M, Mitochondrien; T, axonale Terminalen. Balken entsprechen 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

>

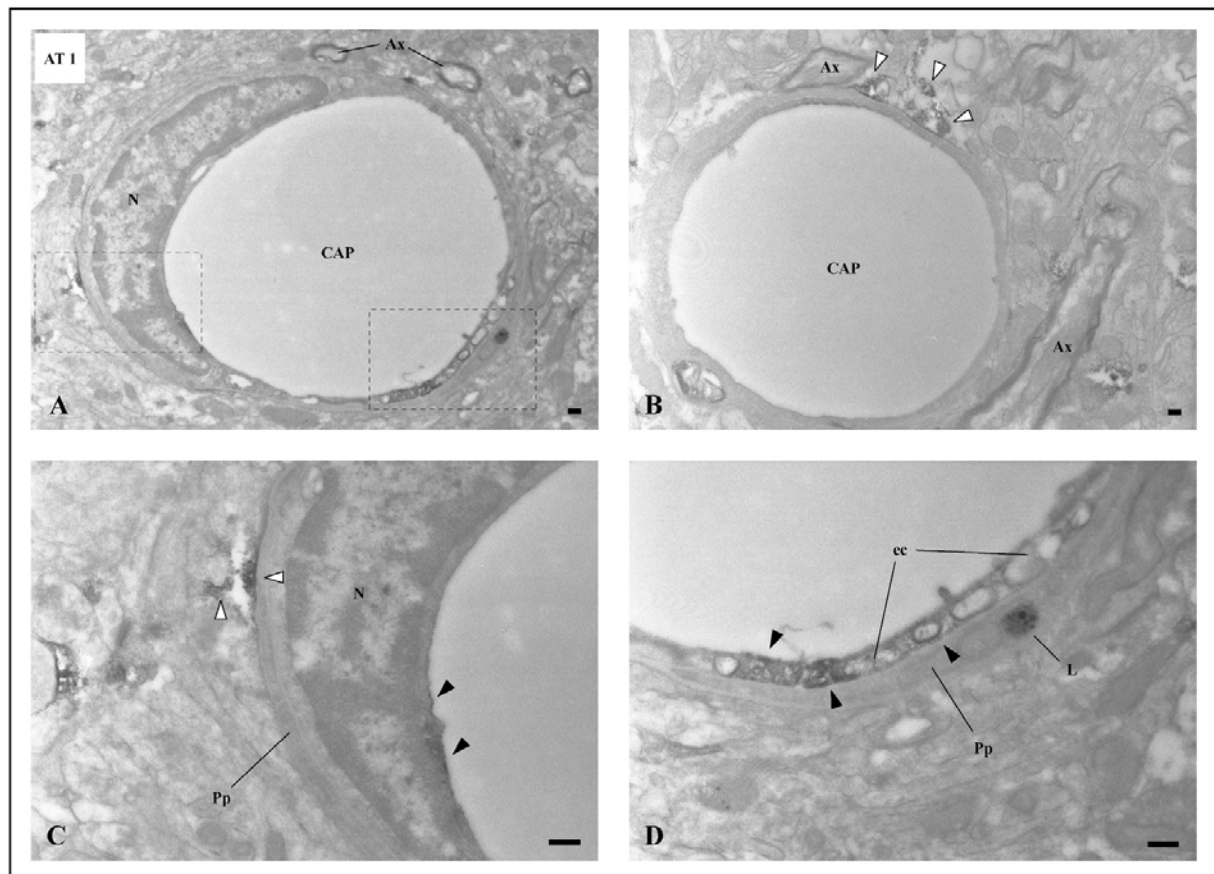


Abb.39:

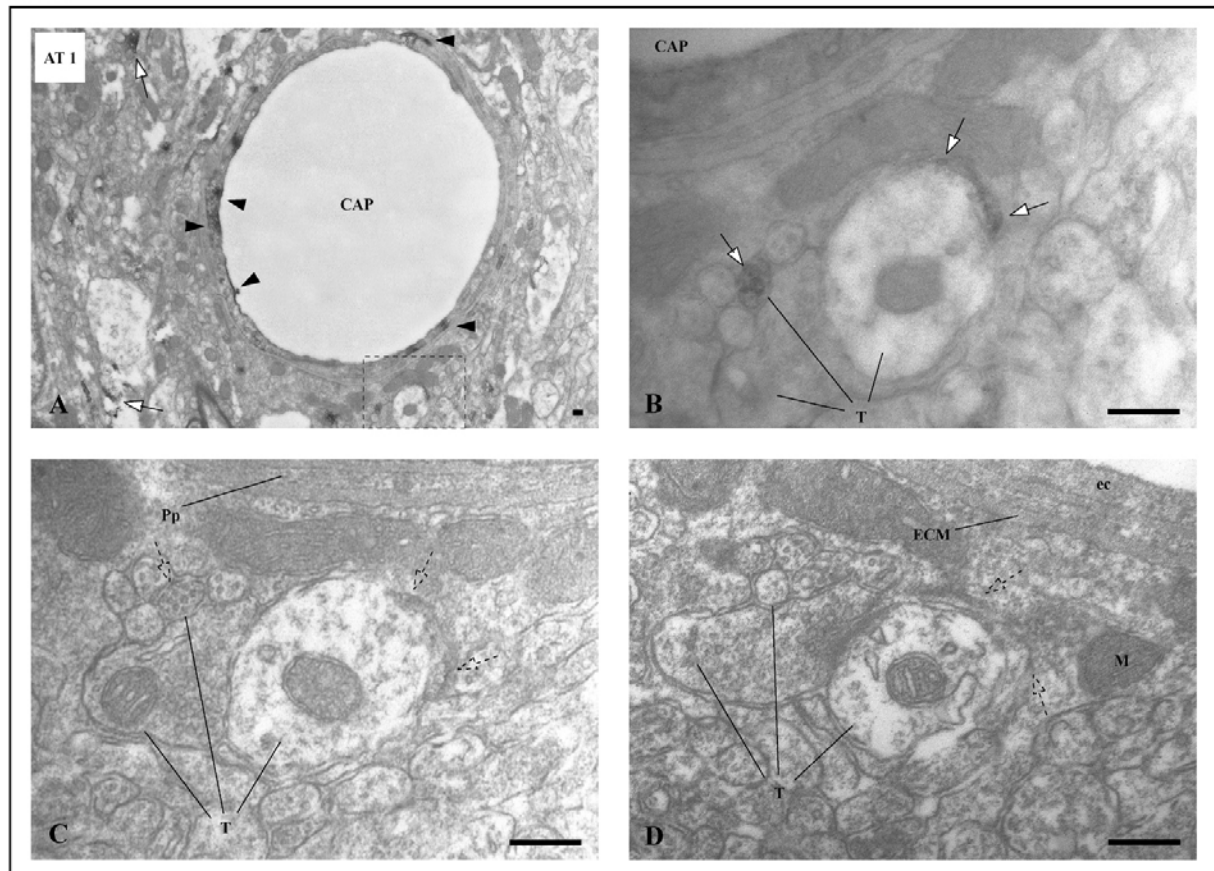


Abb.40:

IV.1.2 AT₁-Rezeptoren in der perivaskulären Region

Obwohl zahlreiche periendotheliale Zellen und neuronale Strukturen die Blutgefäße umgeben, sind die AT₁-IR in der perivaskulären Region eher sporadisch und umspannen die Kapillaren nicht vollständig. Die DAB-Markierungen liegen vielmehr nicht kontinuierlich an den Zellmembranen von astrozytenähnlichen Zellen, die an die extrazelluläre Matrix der Kapillaren angrenzen²⁸ [Abb.39B-C].

Des Weiteren ist das Immunsignal auch an den Zellmembranen von neuronalen Strukturen in näherer oder direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen zu identifizieren [Abb.40A]. DAB-Partikel befinden sich hier an Vesikeln (< 50 nm im Durchmesser) sowie an den Zellmembranen axonaler Terminalen in der perivaskulären Region [Abb.40B].

AT₁-IR-Gebiete finden sich auch in den Perikarya dieser Periendothelzellen [Abb.41A]. Die DAB-Markierungen sind hierbei direkt am endoplasmatischen Retikulum (ER) dieser Zellen lokalisiert [Abb.41B].

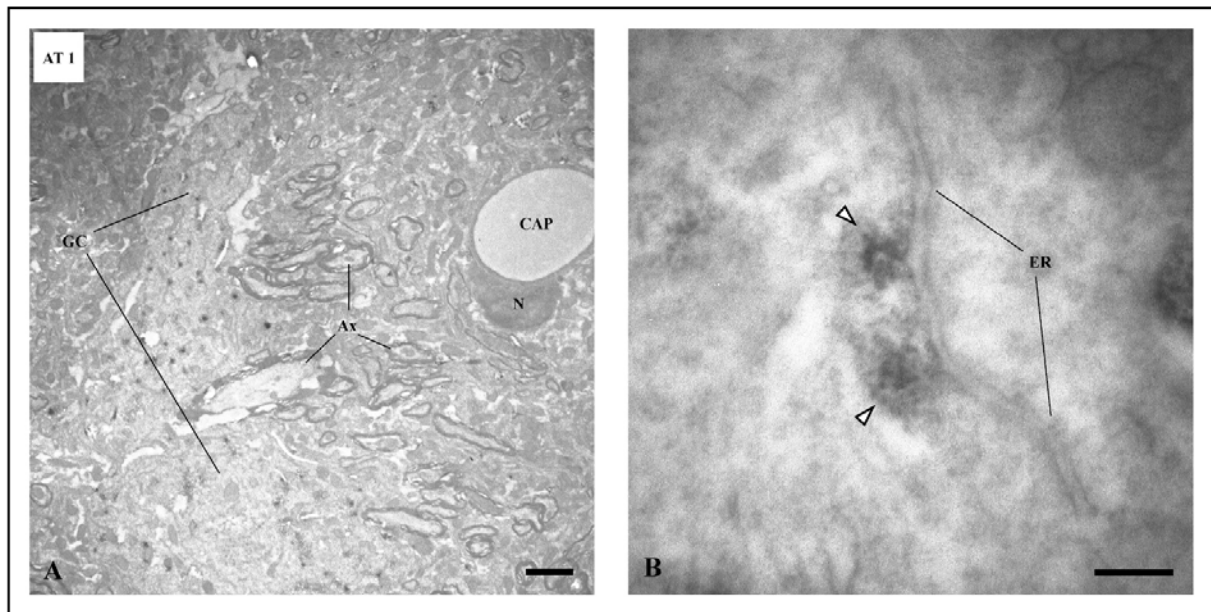


Abb.41: AT₁-IR am endoplasmatischen Retikulum perivaskulärer Zellen.

(A) Unkontrastierter Ultradünnschnitt mit einer Gliazelle - wahrscheinlich ein Astrozyt - nahe einer Kapillare. (B) Höher vergrößertes Detail aus (A) zeigt DAB-Partikel an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (weiße Pfeilspitzen in B). Abkürzungen: wie zuvor; ER, endoplasmatisches Retikulum; GC, Gliazelle. Balken in (A) entspricht 2 µm. Balken in (B) entspricht 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

²⁸ ECM, *extracellular matrix*. Die extrazelluläre Matrix (auch Basallamina) ist ein extra- oder auch interzellulärer Raum der das Blutgefäß inklusive Perizyten umgibt und die endotheliale Basalmembran von den Plasmamembranen der periendothelialen Zellen trennt.

IV.1.3 ANG I/II im Kapillarendothel

Wie die AT₁-IR, ist auch die ANG I/II-IR sowohl an den luminalen²⁹, als auch an den abluminalen³⁰ Membranen der Endothelzellen zu identifizieren [Abb.42C-D]. Weitere DAB-Reaktionsprodukte liegen flockig an Vesikeln und membrangebundenen Organellen im Endothel [Abb.42C-D]. In einigen Fällen zeigen sich im immunreaktiven Endothel auch deutliche Peroxidase-Reaktionsschäden in unmittelbarer Nähe zu DAB-Niederschlägen [Abb.42A-B].

IV.1.4 ANG I/II in der perivaskulären Region

In der perivaskulären Region ist ANG I/II-IR ebenfalls an Periendothelzellen - wahrscheinlich Astrozyten - lokalisiert. Ähnlich der AT₁-IR, umfasst auch die ANG I/II-IR die Blutgefäße nicht vollständig, sondern liegt deutlich sichtbar, aber nicht kontinuierlich, an den Zellmembranen der periendothelialen Zellen, welche die Kapillaren umgeben [Abb.43A und 43C]. Auch im zellgrenznahen Bereich des Zytosols dieser Zellen lassen sich DAB-Partikel in gehäufte Form nachweisen [Abb.43A].

Weitere ANG I/II-IR findet sich in Vesikeln (< 50 nm im Durchmesser) von neuronalen Strukturen, die sowohl in unmittelbarem Kontakt zu den Gefäßen stehen oder sich in der Peripherie der perivaskulären Region befinden [Abb.43B und 43D].

Abb.42: Lokalisation von ANG I/II-IR im Endothel von Kapillaren im Hypothalamus.

(A und B) Unkontrastierte Ultradünnschnitte zeigen Details zweier Kapillaren. (C und D) Höher vergrößerte Ausschnitte von (A und B). DAB-Niederschläge sind an den Zellmembranen und im Zytosol bzw. im Zytoplasma des Endothels, z.B. an Vesikeln und Endosomen lokalisiert (schwarze Pfeilspitzen in A-D). Teils finden sich Peroxidase-Reaktionsschäden im Endothel (* in A, B und C). Abkürzungen: wie zuvor; Balken entsprechen 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

>

Abb.43: ANG I/II-IR in der perivaskulären Region von Kapillaren im Hypothalamus.

(A und C) Elektronenmikroskopische Photographien zeigen ein und dieselbe Kapillare (ca. 5 µm im Durchmesser) aufgenommen von zwei benachbarten Ultradünnschnitten. (A) ist unkontrastiert, während (B) mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert wurde. (B und D) Höher vergrößerte Ausschnitte von (A und C). DAB-Ablagerungen sind sichtbar an periendothelialen Zellmembranen in unmittelbarer Nähe zur ECM (weiße Pfeilspitzen in A und C). Neuronale Strukturen in der perivaskulären Region sind ebenfalls von DAB-Partikeln markiert (weiße Pfeile in B und D). Die Kontrastverstärkung in (C) maskiert das Immunsignal neuronaler Strukturen (gestrichelte Pfeile in D). Abkürzungen: wie zuvor; ec1 und ec2, Endothelzellen 1 und 2; N_p, Perizytennukleus; Tj, Tight Junction = Zonula occludens. Balken entsprechen 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

>

²⁹ Luminal = dem Lumen des Gefäßes oder des Ventrikels zugewandt.

³⁰ Abluminal = vom Lumen des Gefäßes oder des Ventrikels abgewandt.

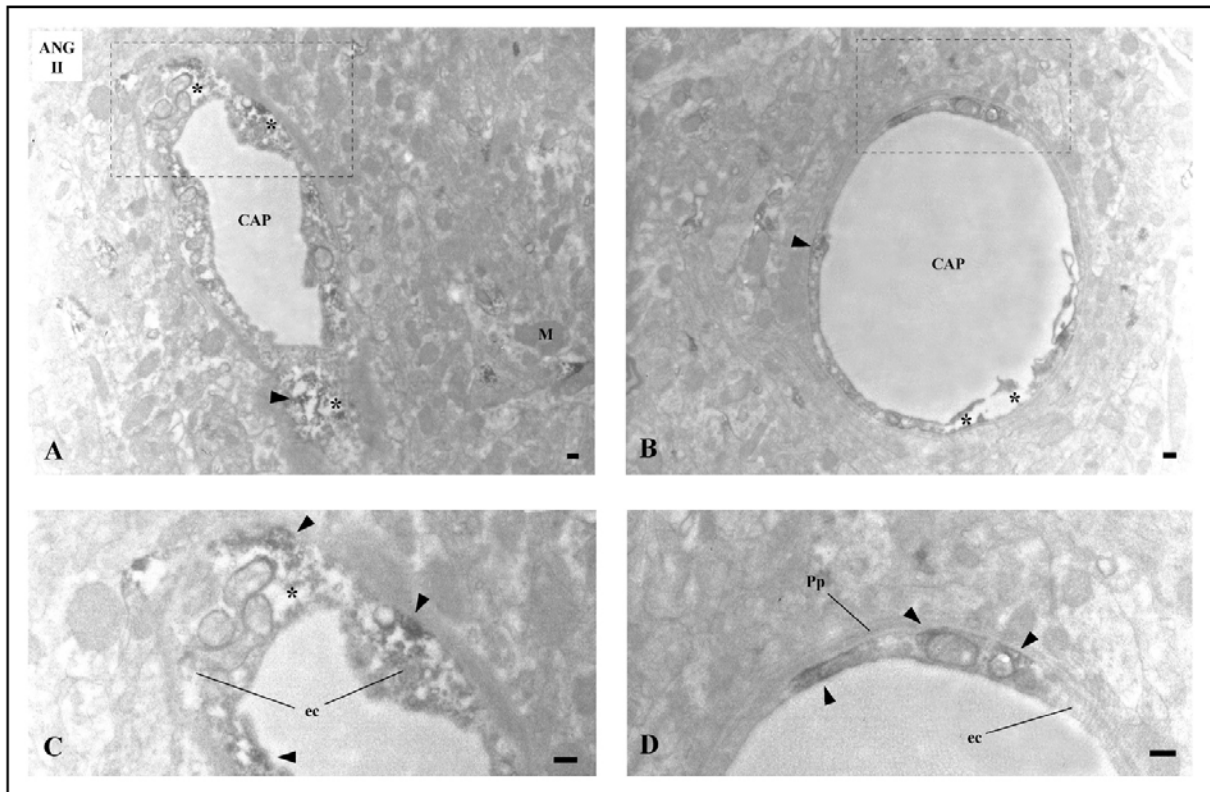


Abb.42

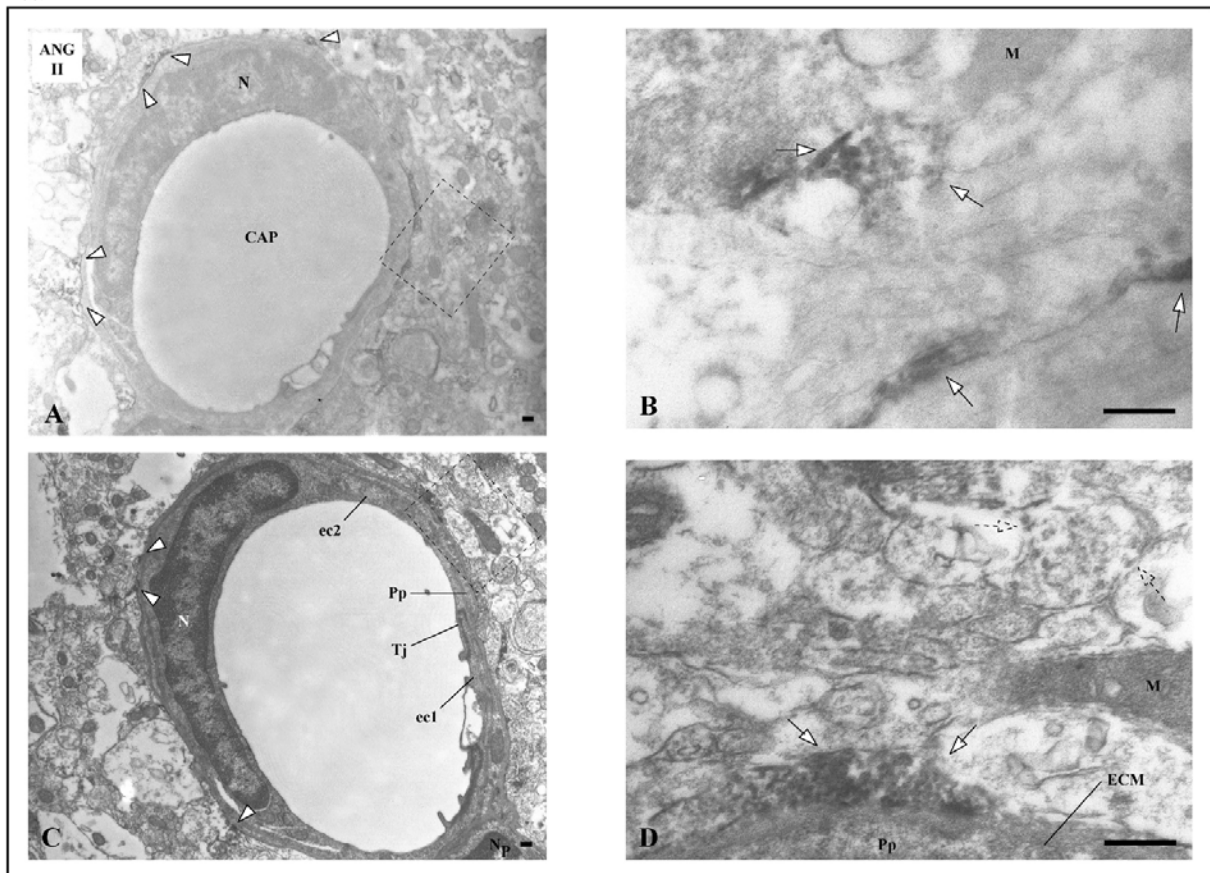


Abb.43

IV.2 ANG I/II und seine AT₁-Rezeptoren im Ependym des 3.Ventrikels

IV.2.1 Intrazelluläre und zellmembranständige AT₁-Rezeptoren

Zwar markiert das DAB-Reaktionsprodukt die Ependymzellen des 3.Ventrikels nicht vollständig, jedoch sind AT₁-IR in beträchtlichen Umfang entlang der Zellmembranen des Ependyms zu beobachten [Abb.44A-B und Abb.45A]. An den Zellgrenzen erscheinen die DAB-Partikel entweder als größere punktuelle Anhäufungen oder als dünne, gepunktete Linien entlang der abluminalen Seite der Zellmembranen [Abb.44C-E und Abb.45A]. Die DAB-Färbung ist besonders stark an den Ein- und Ausbuchtungen entlang der ‚ependymalen Naht’³¹, vorwiegend im apikalen Teil der Zellen. In diesen Regionen ist die Immunreaktivität gelegentlich kolokalisiert mit *Zonulae adhaerentes* [Abb.44C-D]. Im zentralen und basalen Teil des ‚ependymalen Naht’ liegen DAB-Reaktionsprodukte häufig in unmittelbarer Nähe zu Erweiterungen des intrazellulären Raumes [Abb.44E].

Innerhalb der Ependymzellen sind AT₁-IR am ‚rauen endoplasmatischen Retikulum’ (rER) zu erkennen [Abb.45A-B]. Zwar sind nicht alle rER von DAB-Partikeln markiert, jedoch zeigt sich der DAB-Niederschlag sowohl direkt an der zytoplasmatischen Seite zahlreicher rER-Membranen, als auch in benachbarten Vesikeln [Abb.45C].

Ansonsten sind DAB-Reaktionsprodukte weit verbreitet im ependymalen Zytosol. Neben ihrem flockigen Auftreten an Vesikeln unterschiedlicher Größe, haften sie manchmal auch an Mitochondrien [Abb.44A-B und Abb.45A]. Des Weiteren sind DAB-Partikel auch an den äußeren Membranen der Kernhüllen der ependymalen Zellen zu identifizieren [Abb.45A]. Hier liegen sie entweder als größere Anhäufungen - vermutlich in der Nähe der Kernporen - oder als gepunktete Linie entlang der Kernmembran.

Abb.44: AT₁-Rezeptoren im Ependym des 3.Ventrikels.

(A und B) Photographien unkontrastierter Ultradünnschnitte mit ependymalen Zellen. (C-E) Höher vergrößerte Details von (A und B). DAB-Partikel liegen im Zytosol verteilt, oft lokalisiert an Vesikeln (weiße Pfeile in A und B) und Zellgrenzen (schwarze Pfeilspitzen in A und B). DAB-Diffusionsartefakte haften gelegentlich an Mitochondrien (weiße Pfeilspitzen in A und B). Höher vergrößerte Ausschnitte demonstrieren DAB-Niederschläge an den Zellmembranen der ependymalen Naht (schwarze Pfeilspitzen in C-E). Abkürzungen: wie zuvor; AB, abluminale Seite; D, Dictyosom; tG, Trans-Golgi-Netz; *, Erweiterungen des Extrazellularraums. Balken entsprechen 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

>

Abb.45: AT₁-IR am endoplasmatischen Retikulum ependymaler Zellen.

(A) Unkontrastierter Ultradünnschnitt mit ependymalen Zellen. DAB-Ablagerungen sind diffus im Zytosol verteilt, oft lokalisiert an Vesikeln (weiße Pfeile in A) und Zellgrenzen (schwarze Pfeilspitzen in A). DAB-Niederschläge finden sich auch an der äußeren der beiden Kernhüllen (breiter schwarzer Pfeil in A). DAB-Diffusionsartefakte haften gelegentlich an Mitochondrien (weiße Pfeilspitzen in A). (C) Höher vergrößerter Ausschnitt von (A) zeigt DAB-Partikel an der endoplasmatischen Membran des rER und an Vesikeln in der Nähe des rauen- und des Übergangs-ER (tER). (offene Pfeile in C). (B) Doppelt kontrastierter Nachbarschnitt von (A). (D) Höher vergrößertes Detail von (B). DAB-Niederschläge sind durch die Kontrastverstärkung maskiert und nicht von ihrer ultrastrukturellen Umgebung abzugrenzen. Abkürzungen: wie zuvor; c, Cilien; In, Zelleinstülpungen; Jc, junction complexes; Mv, Mikrovilli; rER, raues Endoplasmatisches Retikulum; tER, Übergangs- (transitional-) ER; tV, Übergangsvesikel des tER. Balken entsprechen 0,2 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

>

³¹ Aus dem Englischen übernommen: *ependymal lining*. Zellmembranen, welche die Interzellularspalten des Ependyms flankieren.

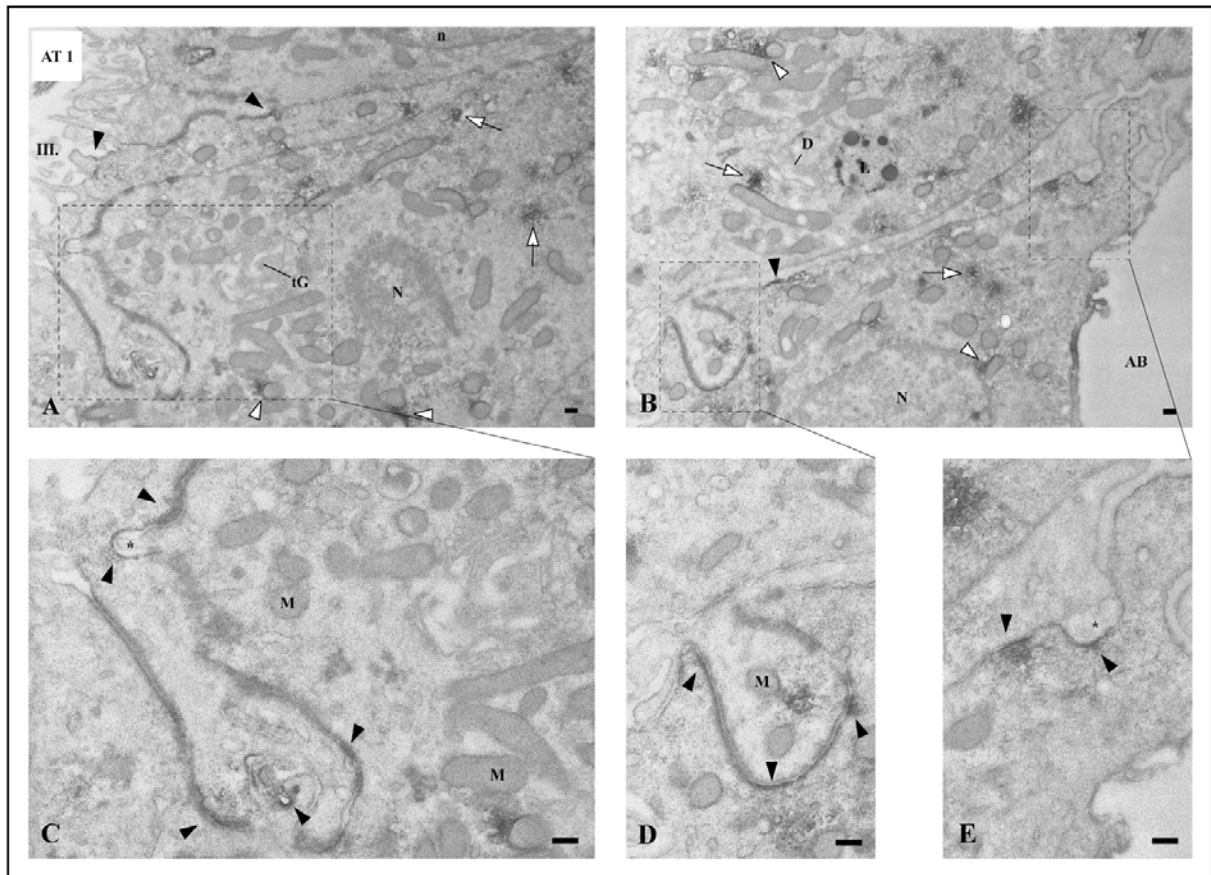


Abb.44:

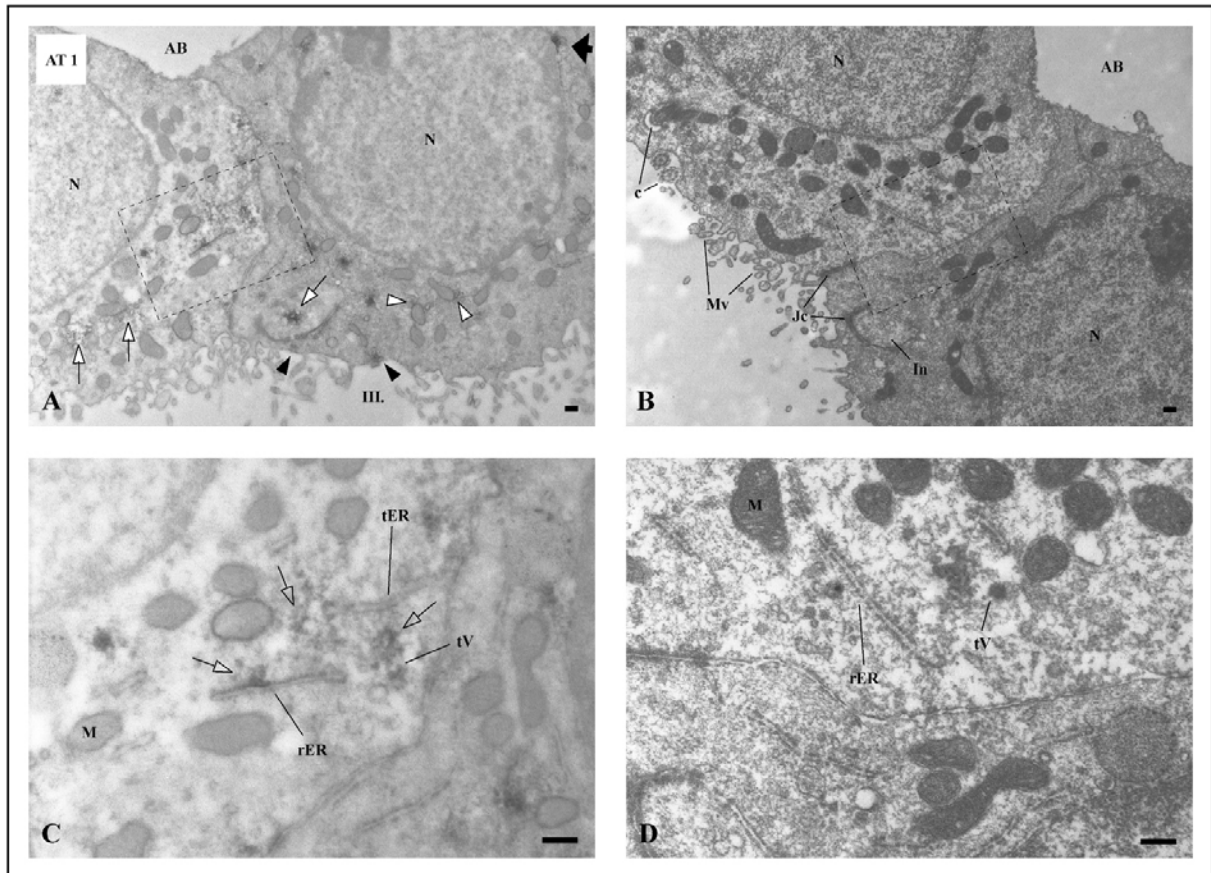


Abb.45:

IV.2.2 Intrazelluläres und zellmembranständiges ANG I/II

Vergleichbar mit der AT₁-IR ist auch die ANG I/II-IR im Ependym des 3.Ventrikels weit verbreitet [Abb.46A-B]. DAB-Ablagerungen können an den Zellmembranen - gelegentlich kolokalisiert mit *Zonulae adhaerentes* - beobachtet werden [Abb.46D und 46F]. Im Allgemeinen befinden sich DAB-Reaktionsprodukte direkt an den Zellgrenzen oder sind an zellgrenznahe Vesikel gebunden. An den Zellmembranen liegt die ANG I/II-IR entweder als großflächiger DAB-Niederschlag oder als dünne, gepunktete Linie vor [Abb.46D und 46F].

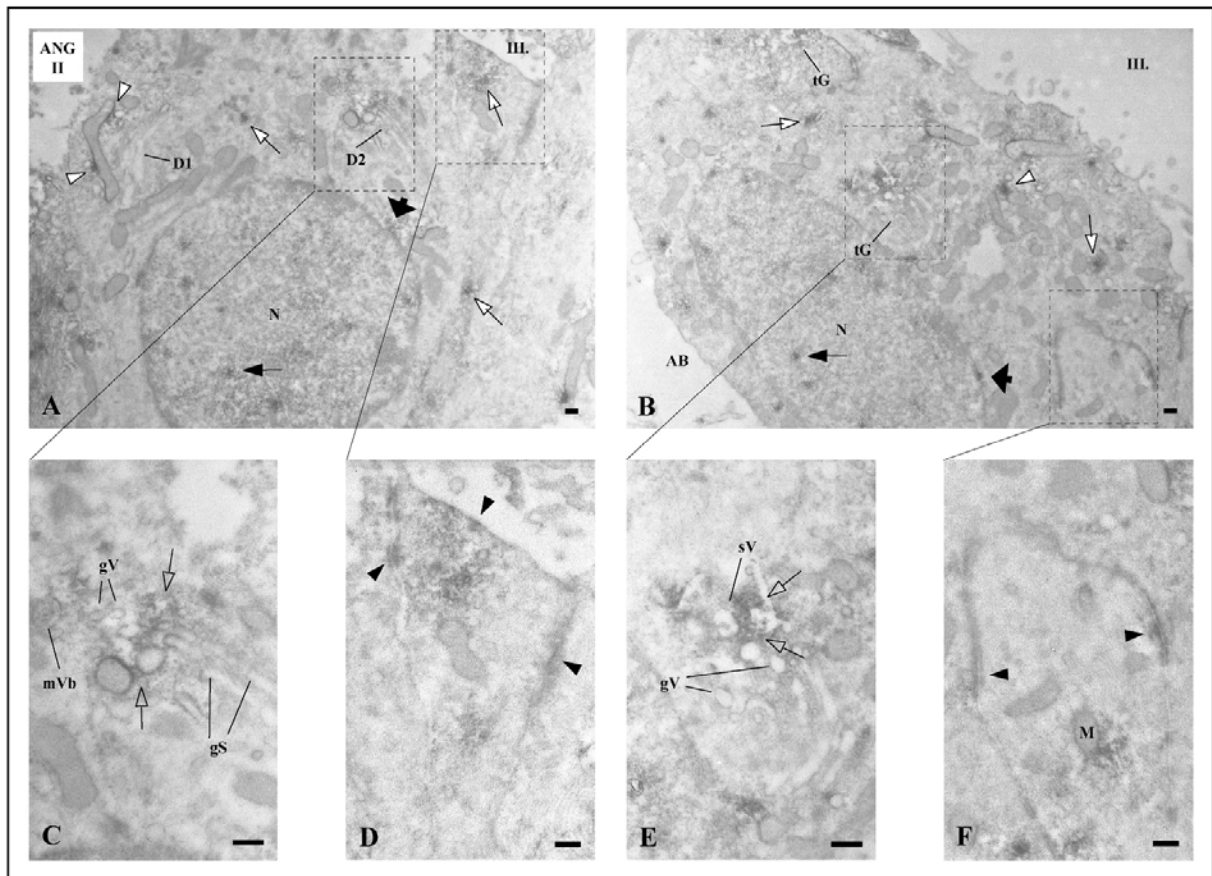


Abb.46: ANG I/II-IR am Golgi Apparat ependymaler Zellen des 3.Ventrikels.

(A und B) Unkontrastierte Ultradünnschnitte mit ependymalen Zellen. (C - F) Höher vergrößerte Ausschnitte von A und B). Die DAB-Reaktionsprodukte liegen im Zytosol verteilt und sind häufig an Vesikeln lokalisiert (weiße Pfeile in A und B). DAB-Niederschläge finden sich auch im Kernplasma (schwarze Pfeile in A und B) sowie an der äußeren Kernhülle (breite schwarze Pfeile in A und B). Gelegentlich haften DAB-Diffusionsartefakte an Mitochondrien (weiße Pfeilspitzen in A und B). DAB-Partikel sind sowohl an den lateralen Zisternen (offene Pfeile in C), als auch an Golgi-Vesikeln und sekretorischen Vesikeln des Trans-Golgi-Netzes (offene Pfeile in E) zu identifizieren. Weitere DAB-Niederschläge liegen an den ependymalen Zellmembranen (schwarze Pfeilspitzen in D und F). Abkürzungen: wie zuvor; D1 und D2, Dictyosom 1 und 2; gS, Golgistapel; gV, Golgi-Vesikel, mVB, multivesikuläre Körper; sV, sekretorische Vesikel. Balken entsprechen 0,2 μ m. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2003 [125].

Zytoplasmatische bzw. zytosolische ANG I/II-IR sind am und um den *Golgi Apparat* zu erkennen [Abb.46A-B]. Die DAB-Partikel sind hierbei direkt an den lateralen Zisternen der Golgistapel sowie an und zwischen Sekret- und Transportvesikeln des Trans-Golgi-Netzes lokalisiert [Abb.46C und 46E].

Darüber hinaus sind DAB-Reaktionsprodukte im Kernplasma und an den äußeren Kernhüllen der ependymalen Zellen zu identifizieren [Abb.46A-B].

IV.3 Einfach- und Doppelkontrastierungen verdecken immunreaktive Details

Die Auswertung der Kontrastierungstests zeigt, dass beide Verfahren (Einfach- und Doppelkontrastierung) die Lokalisation des Immunsignals in allen untersuchten Zelltypen deutlich einschränken.

Ein Vergleich von nicht, einfach und doppelt kontrastiertem Gewebe demonstriert, dass besonders die feinen AT₁-IR an neuronalen Strukturen, wie z.B. an axonalen Terminalen selbst im einfach kontrastierten Gewebe erschwert wird [Abb.40C]. Im doppelt kontrastierten Nachbarschnitt sind Spuren der Immunreaktion nicht mehr auszumachen [Abb.40D].

Auch im Falle der ANG I/II-IR sind DAB-Partikel nach Doppelkontrastierungen nur sehr eingeschränkt sichtbar [Abb.43C]. Besonders die zuverlässige Identifizierung von immunreaktiven Vesikeln in neuronalen Strukturen [Abb.43D] oder die Interpretation von immunreaktiven Membranen mit höherer Elektronendichte (z.B. synaptische Membranen) [Abb.56A] wird deutlich erschwert.

Doppelt kontrastierte Präparate der Wand des 3.Ventrikels zeigen ebenfalls, dass die Behandlung mit Uranylazetat und Bleizitrat das Immunsignal signifikant maskiert und die DAB-Reaktionsprodukte gar nicht oder teilweise nicht von der zellulären Umgebung (z.B. elektronendichteren Vesikeln, dem rauen endoplasmatischen Retikulum, Zonen freier Ribosomen, etc.) abgegrenzt werden können [Abb.45B und 45D].

IV.4 Elektronenmikroskopische Lokalisation von ANG I/II und seiner AT₁-Rezeptoren im SCN

IV.4.1 ANG I/II und seine AT₁-Rezeptoren in Blutgefäßen im SCN und in seiner direkten Umgebung

IV.4.1.1 ANG I/II im Endothel

ANG I/II-IR kann sowohl an größeren Blutgefäßen (> 10 µm) nahe des SCN [Abb.47A-B], als auch an Kapillaren innerhalb des SCN beobachtet werden [Abb.48A und Abb.49A-B]. Zahlreiche Vesikel (50-75 nm im Durchmesser), die entweder nahe der luminalen endothelialen Zellmembran liegen oder in diese durch exo- oder endozytotische Prozesse inkorporiert sind, zeigen deutliche ANG I/II-IR [Abb.48C]. Die abluminale Seite der endothelialen Zellgrenze weist ebenfalls ANG I/II-IR auf. Die DAB-Partikel sind hier direkt an der Zellmembran und an nahe gelegenen Vesikeln (50-75 nm im Durchmesser) lokalisiert [Abb.48C]. Weitere DAB-Reaktionsprodukte liegen flockig an membrangebundenen Organellen (z.B. Endosomen) und haften gelegentlich an Mitochondrien [Abb.48B und 48D]. DAB-Ablagerungen können außerdem noch an den äußeren Kernhüllen und in gewissem Umfang auch innerhalb des Kernplasmas der Endothelzellen wahrgenommen werden [Abb.48B, 48D und Abb.49A].

IV.4.1.2 ANG I/II in der perivaskulären Region

In der perivaskulären Region ist das ANG I/II-Immunsignal in und an periendothelialen Zellen - überwiegend Gliazellen - lokalisiert [Abb.49A-B]. Die DAB-Färbung liegt hier nicht kontinuierlich an jenen Zellmembranen, die im Kontakt zur ECM stehen [Abb.48C und Abb.49B]. Des Weiteren sind DAB-Partikel großflächig im zellgrenznahen Zytosol lokalisiert [Abb.49A-B]. ANG I/II-IR endo- oder exozytotische Vesikel (50-75 nm im Durchmesser) sind ebenfalls an den periendothelialen Zellmembranen zu erkennen. Sie liegen überwiegend gegenüber immunreaktiven Abschnitten der endothelialen Zellmembranen [Abb.48C]. Periendothelzellen - einige ähneln Dendriten - in der äußeren perivaskulären Region weisen gleichfalls eine ANG I/II-IR auf. Die DAB-Ablagerungen liegen hier an Zellgrenzen und Vesikeln im Zytosol dieser dendritenähnlichen Strukturen oder an Gliaelementen, welche diese Strukturen umgeben [Abb.48B-C]

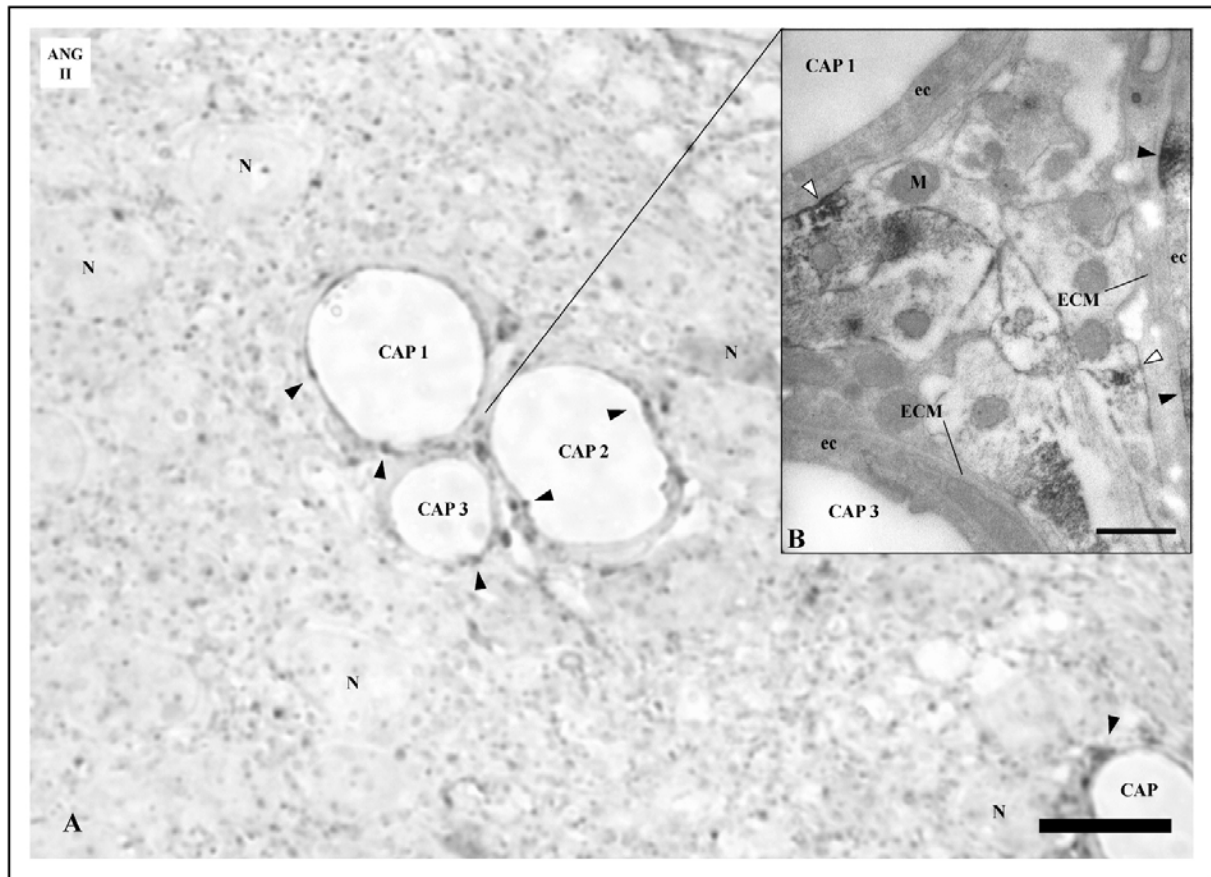


Abb.47: ANG I/II-IR im Endothel und in der perivaskulären Region von Arteriolen in unmittelbarer Nähe zum *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN).

Durch eine Korrelation von Licht- und Elektronenmikroskopie wird eine schnelle und zuverlässige Analyse interessanter Regionen ermöglicht. (A) Die hoch vergrößerte lichtmikroskopische Photographie eines Semidünnschnittes (1 µm Dicke) zeigt drei dicht aneinander liegende Arteriolen in unmittelbarer Nähe zu SCN-Neuronen (gleiche Aufnahme wie 38B). DAB-Ablagerungen zeigen sich am Endothel der Arteriolen (schwarze Pfeilspitzen in A). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines unkontrastierten Ultradünnschnittes demonstriert eine Ausschnittsvergrößerung der Region, in welcher sich die drei in (A) dargestellten Gefäße am nächsten sind. ANG I/II-IR ist in den Endothelien und an den abluminalen endothelialen Zellmembranen (schwarze Pfeilspitzen in B) lokalisiert. Weitere DAB-Partikel sind an den Zellmembranen und in Vesikeln von periendothelialen Zellen zu identifizieren (weiße Pfeilspitzen in B). Ihre Membranen liegen direkt an der ECM, welche die Arteriolen umgibt. Abkürzungen: wie zuvor; CAP1 bis CAP3, Gefäßlumen 1 bis 3. Balken in (A) entspricht 10 µm. Balken in (B) entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

Abb.48: ANG I/II-IR im Endothel von SCN-Kapillaren.

Basierend auf der lichtmikroskopischen Beobachtung (Ausschnitt in (A)), wurde eine Kapillare für eine elektronenmikroskopische Inspektion gewählt. (A) Elektronenmikroskopische Photographie eines unkontrastierten Ultradünnschnitts mit einer SCN-Kapillare. (B - D) Ausschnittsvergrößerungen aus (A). Starke DAB-Niederschläge finden sich an endothelialen Kompartimenten und an den luminalen und abluminalen Zellmembranen des Endothels (schwarze Pfeilspitzen in B und D). Immunreaktive endo- und/oder exozytische Vesikel sind an der luminalen endothelialen Zellmembran zu identifizieren (breite schwarze Pfeilspitzen in C). Des Weiteren sind markierte Vesikel sowohl an der immunreaktiven abluminalen endothelialen Zellmembran (breite offene Pfeilspitze in C), als auch den immunreaktiven periendothelialen Zellmembranen, welche die ECM kontaktieren, lokalisiert (breite weiße Pfeilspitze in C). DAB-Ablagerungen finden sich gleichfalls an der äußeren Kernhülle der Endothelzelle (breiter schwarzer Pfeil in D), sowie in ihrem nuklearen Plasma (schwarzer Pfeil in B). In der äußeren perivaskulären Region ist das DAB-Reaktionsprodukt an Gliakomponenten, welche an dendritenähnliche Strukturen grenzen, lokalisiert (weiße Pfeile in C). Abkürzungen: wie zuvor; V, Vesikel. Balken entsprechen 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

Abb.49: ANG I/II-IR im Endothel und in der perivaskulären Region von SCN-Kapillaren.

Basierend auf der lichtmikroskopischen Betrachtung zweier SCN-Kapillaren (Ausschnitt in (A und B)), wurden zwei Kapillaren für eine weitere elektronenmikroskopische Inspektion gewählt. (A und B) Unkontrastierte Ultradünnschnitte durch SCN-Kapillaren demonstrieren ANG I/II-IR an den Zellmembranen und den Endothelien der Gefäße (schwarze Pfeilspitzen in A), sowie an periendothelialen Zellmembranen, welche die ECM kontaktieren (weiße Pfeilspitzen in A und B). Des Weiteren sind DAB-Ablagerungen im Zytosol und an den Zellmembranen von dendritenähnlichen Strukturen in der äußeren perivaskulären Region zu erkennen (weiße Pfeile in B). DAB-Partikel finden sich ebenso im nuklearen Plasma von Endothelzellen (schwarze Pfeile in A) und Zellkernen in der perivaskulären Region (schwarze Pfeile in B). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entsprechen 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

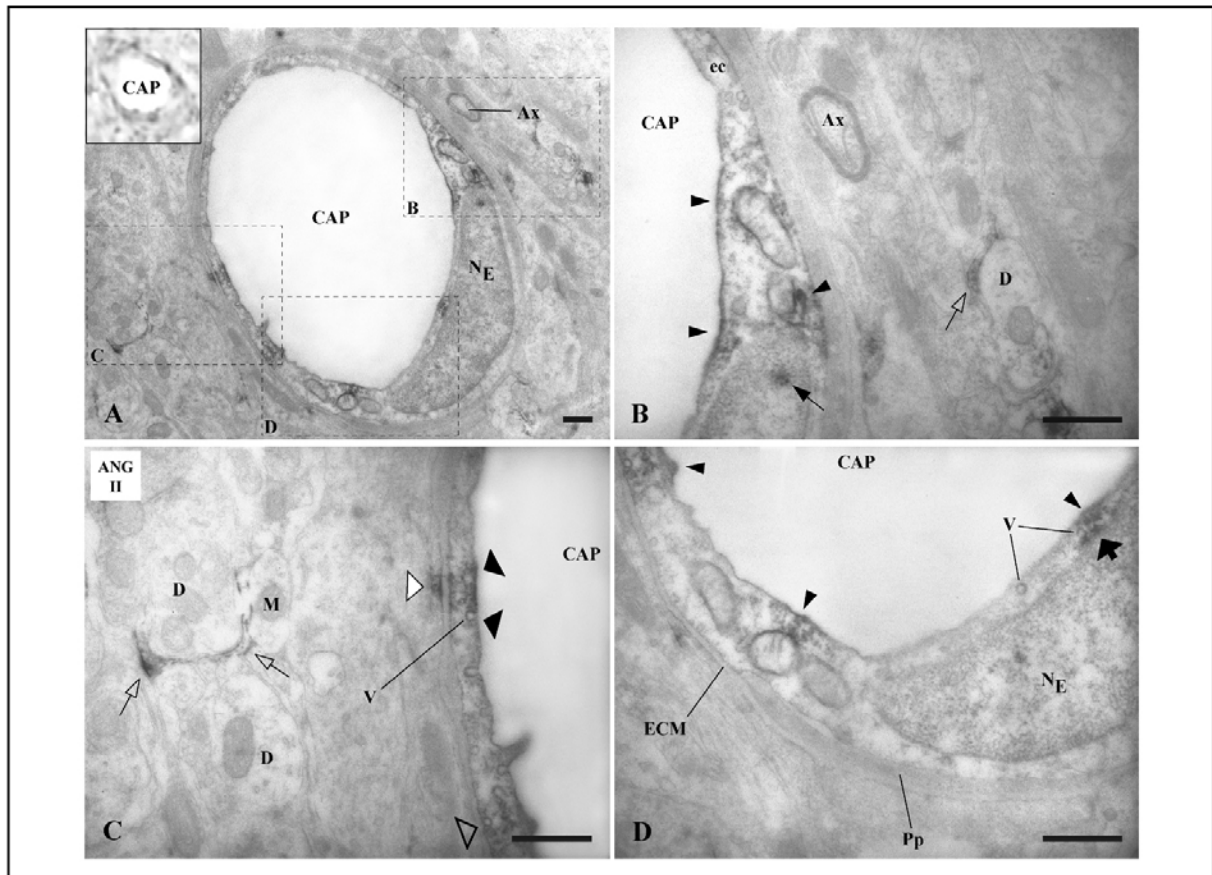


Abb.48:

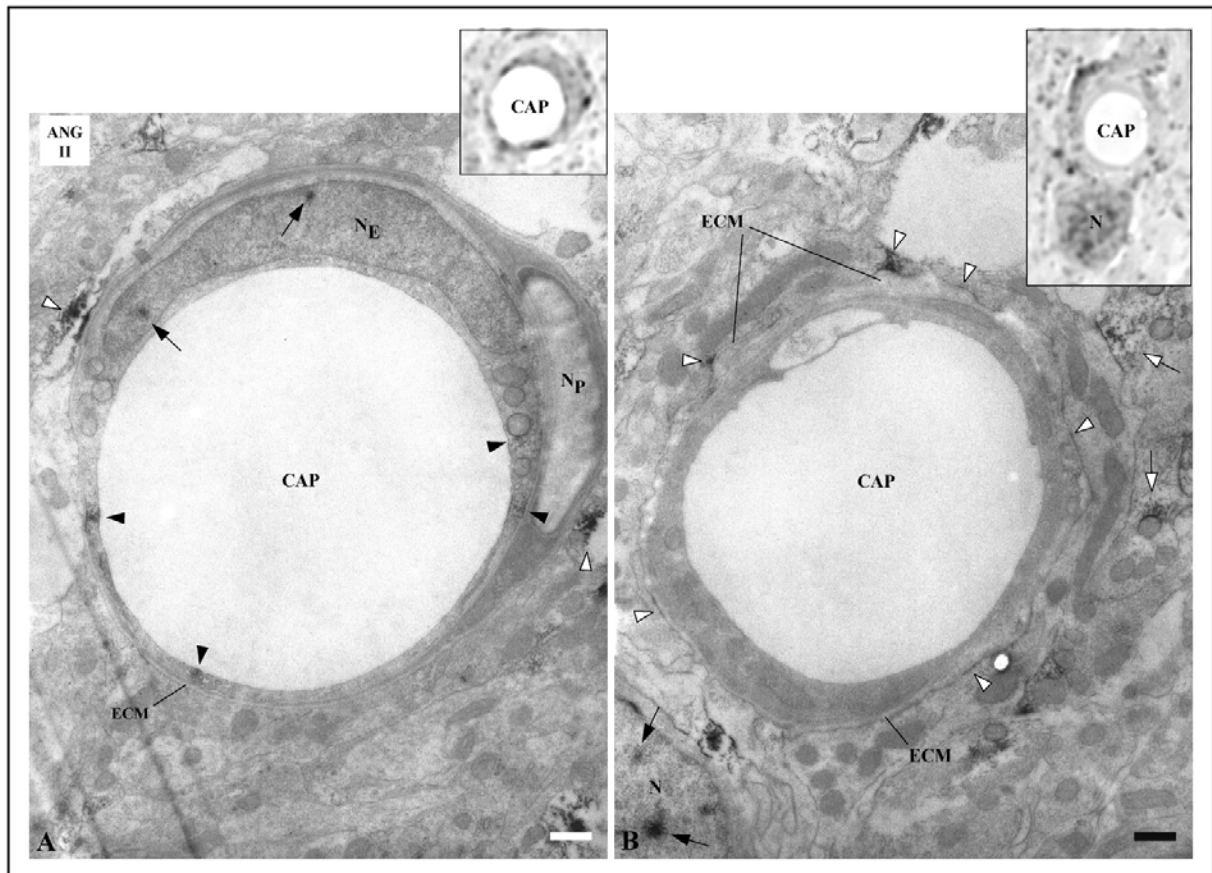


Abb.49:

IV.4.1.3 AT₁-Rezeptoren im Endothel

Das Kapillarendothel zeigt ähnlich der ANG I/II-IR eine klare AT₁-IR [Abb.50A, 50C und 50E]. DAB-Partikel sind sowohl an der luminalen, als auch an der abluminalen endothelialen Zellmembran auszumachen. Endo- oder exozytotische Vesikel (50-75 nm im Durchmesser) nahe der Zellmembran oder in diese inkorporiert, weisen hier eine deutliche AT₁-IR auf [Abb.50C und 50E]. Diese findet sich auch im Zytosol der Endothelzellen und liegt hier vorwiegend an Vesikeln unterschiedlicher Größe und an membrangebundenen Organellen (z.B. Endosomen) [Abb.50C und 50E]. Im Gegensatz zur ANG I/II-IR weisen die endothelialen Zellkerne keine AT₁-IR auf [Abb.50A und 50B].

IV.4.1.4 AT₁-Rezeptoren in der perivaskulären Region

Genau wie im Falle der ANG I/II-IR, lässt sich auch eine eindeutige AT₁-IR an den Zellmembranen der Periendothelzellen - wahrscheinlich Astrozyten - ausmachen. Obwohl die Immunreaktion die Gefäßwände nicht vollständig umgibt, sind weite Teile der an die ECM der Gefäße grenzenden Zellmembranen von DAB-Partikeln fein markiert [Abb.50B]. An diesen markierten Bereichen periendothelialer Zellgrenzen zeigen auch zahlreiche endo- oder exozytotische Vesikel, die gegenüber den immunreaktiven Abschnitten der endothelialen Zellmembran liegen, deutliche AT₁-IR [Abb.50B und 50D]. Weitere DAB-Ablagerungen in der perivaskulären Region sind sowohl an Zellmembranen, die andere periendotheliale Zellen kontaktieren, als auch an Vesikeln nahe dieser Membranen zu erkennen [Abb.50B und 50D].

Abb.50: Lokalisation von ANG II-Bindungsstellen in endothelialen und periendothelialen Zellen im SCN.

(A) Elektronenmikroskopische Abbildung eines unkontrastierten Ultradünnschnittes zeigt eine Übersichtsaufnahme einer Kapillare im SCN. Das Gefäß liegt zwischen neuronalen Perikarya und axonalen Fortsätzen und wird von Perizyten begleitet. Die Rahmen zeigen die Regionen der in (B und C) vergrößert dargestellten Details. Starke AT₁-IR ist an luminalen Zellmembran und an endothelialen Vesikeln lokalisiert (schwarze Pfeilspitze in C). Weitere DAB-Ablagerungen lassen sich sowohl an endo- und/oder exozytotischen Vesikeln nahe der abluminalen endothelialen Zellmembran (breite schwarze Pfeilspitzen in B und C), als auch an periendothelialen Zellmembranen (breite weiße Pfeilspitzen in B) identifizieren. In der perivaskulären Region liegt das Immunsignal an Vesikeln und Zellmembranen der Periendothelzellen (weiße Pfeilspitzen in B und C). (D und E) Elektronische Nachvergrößerungen ermöglichen eine klare Visualisierung endo- und/oder exozytotischer Vesikel und den Zellmembranen beiderseits der ECM. Abkürzungen: wie zuvor; eV, endo- und/oder exozytotischen Vesikel. Balken entsprechen 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

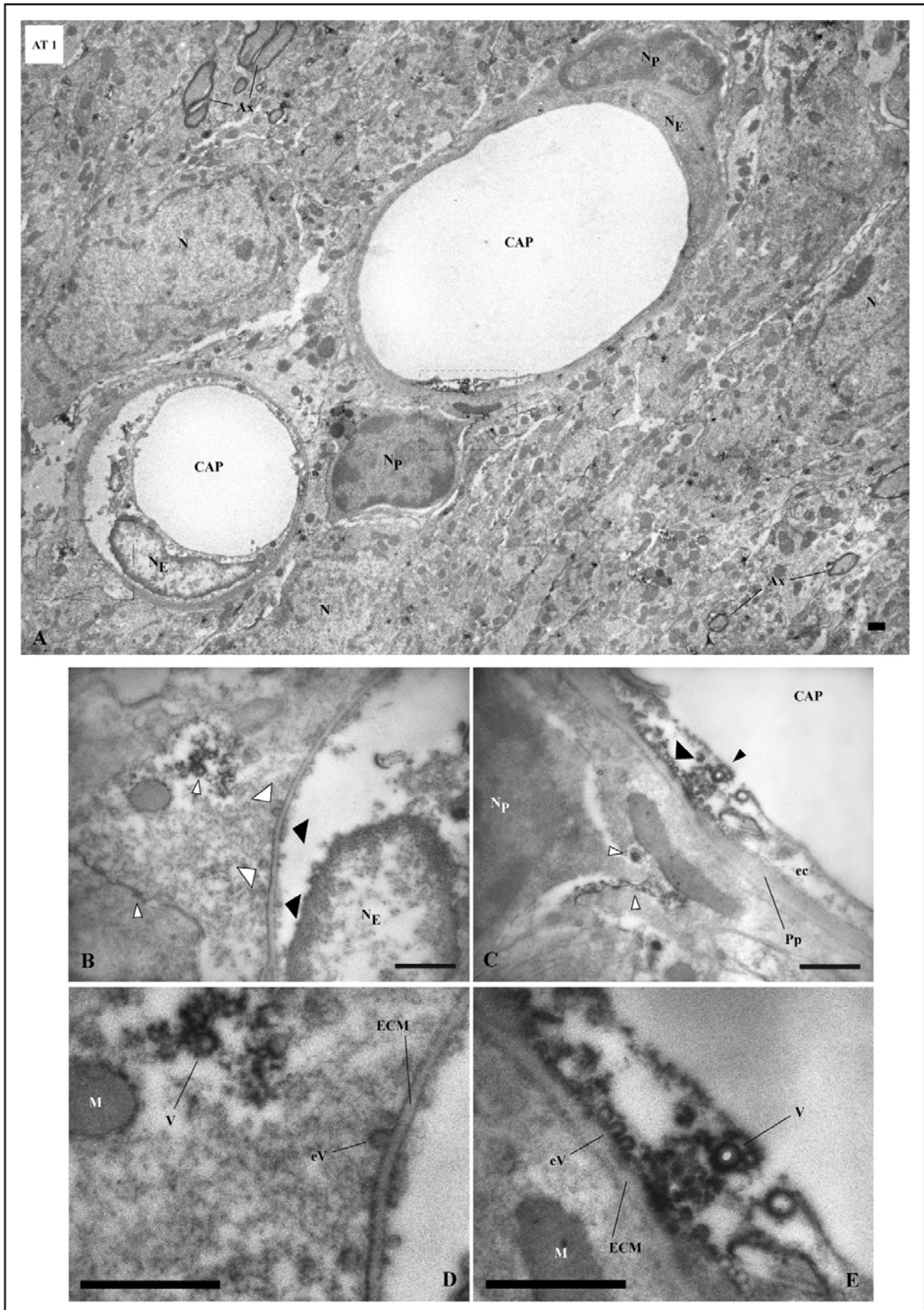


Abb.50:

IV.4.2 ANG I/II und seine AT₁-Rezeptoren im Neuropil des SCN

IV.4.2.1 ANG I/II in Neuronen

Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene bestätigen die lichtmikroskopischen Interpretationen der ANG I/II-IR in SCN-Neuronen von normotensiven Sprague-Dawley Ratten. Ein deutliches Immunsignal ist sowohl an den äußeren Kernhüllen, als auch im Kernplasma zahlreicher Neurone zu identifizieren. Die markierten Neurone liegen entweder in unmittelbarer Nachbarschaft zu Kapillaren [Abb.49B] oder befinden sich tief im SCN-Gewebe, also deutlich entfernt von Blutgefäßen [Abb.51A und Abb.52]. Innerhalb der Zellkerne liegen die DAB-Partikel unregelmäßig verteilt und werden manchmal von Peroxidase-Reaktionsschäden im nuklearen Plasma begleitet [Abb.51B].

Die Zellkerne der untersuchten Perizyten zeigen keinerlei [Abb.48A] und die Zellkerne des Endothels eine deutlich schwächere ANG I/II-IR als die markierten Zellen [Abb.48A und Abb.49A].

Innerhalb der Zelle lassen sich weitere DAB-Niederschläge erkennen. Sie sind an Vesikeln im Zytosol lokalisiert und lagern sich manchmal an Mitochondrien an [Abb.52]. ANG I/II-IR findet sich auch am *Golgi Apparat* dieser Neurone. Das Immunsignal ist hier an den Membranen der lateralen Zisternen und der Golgi Stapel lokalisiert [Abb.53]. Ähnlich den DAB-Markierungen im Kern, ist auch die DAB-Färbung im Zytosol und Zytoplasma teilweise von Peroxidase-Reaktionsschäden begleitet [Abb.52].

Abb.51: ANG I/II-IR an den Kernhüllen und im nuklearen Plasma von SCN-Neuronen.

(A) Eine hoch vergrößerte Aufnahme eines Semidünnschnittes (gleiche Aufnahme wie 37A) zeigt DAB-Reaktionsprodukte im SCN-Neuropil. DAB-Ablagerungen treten gehäuft an Zellkernen (schwarze Pfeile in A) und Endothelien auf. (B) Basierend auf der lichtmikroskopischen Betrachtung des SCN-Neuropils in (A) wurde ein besonders massiv von DAB-Partikeln markierter Zellkern (N₁) für eine weitere elektronenmikroskopische Inspektion ausgewählt. DAB-Niederschläge sind vorwiegend im nuklearen Plasma (schwarze Pfeile in B) aber auch an der äußeren Kernhülle (breiter schwarzer Pfeil in B) lokalisiert. Peroxidase-Reaktionsschäden sind gleichfalls im nuklearen Plasma sichtbar (*). Der Rahmen in (B) zeigt die Region einer Ausschnittsvergrößerung, die in Abbildung 53 dargestellt ist. Abkürzungen: wie zuvor. Balken in (A) entspricht 10 µm. Balken in (B) entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

Abb.52: Lokalisation von ANG I/II-IR im nuklearen Plasma und im Zytosol von SCN-Neuronen.

Die elektronenmikroskopische Photographie eines Ultradünnschnittes durch ein SCN-Neuron zeigt ANG I/II-IR im nuklearen Plasma (schwarze Pfeile) und an der äußeren Kernhülle (breite schwarze Pfeile). DAB-Reaktionsprodukte im Zytosol liegen meist an Vesikeln (weiße Pfeile), haften gelegentlich aber auch an Mitochondrien (weiße Pfeilspitze). Peroxidase-Reaktionsschäden sind im Zytosol sichtbar (*). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

ANG II

98

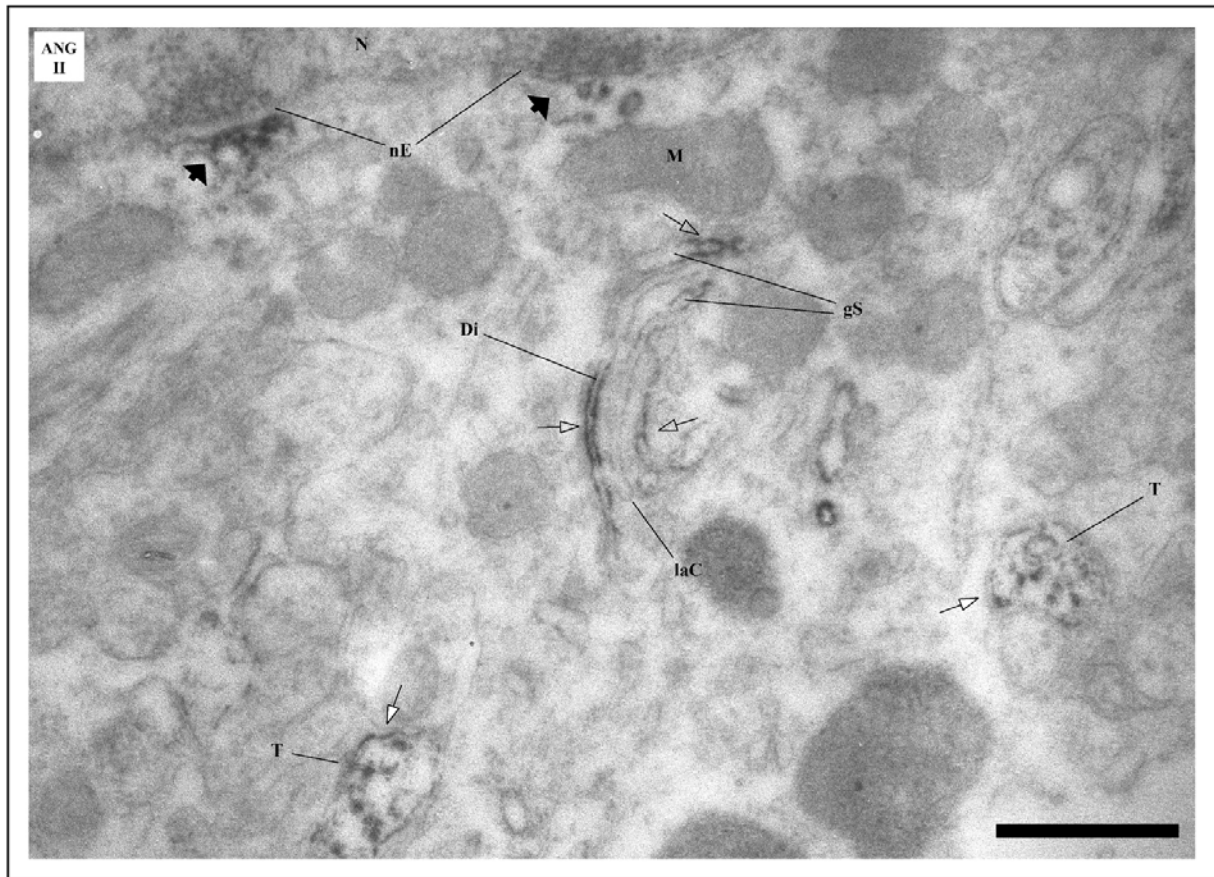


Abb.53: ANG I/II-IR am Golgi Apparat und an der Kernhülle von SCN-Neuronen.

Hoch vergrößerte Details aus Abbildung 51 demonstrieren DAB-Ablagerungen an Stapeln und lateralen Zisternen des Golgi Apparats (offene Pfeile). Weitere DAB-Partikel sind an der äußeren der beiden Kernmembranen, sowie an benachbarten Vesikeln zu identifizieren (breite schwarze Pfeile). Darüber hinaus ist ANG I/II-IR an den Zellmembranen und Vesikeln von axonalen Terminalen in der Nähe des Perikaryons lokalisiert (weiße Pfeile). Abkürzungen: wie zuvor; laC, laterale Zisterne; nE, nuclear envelope (Kernhülle). Balken entspricht 0,5 μm . Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

IV.4.2.2 ANG I/II in axonalen Terminalen, Dendriten und Gliaelementen

In der Peripherie des SCN-Neuropils ist die ANG I/II-IR weit verbreitet. DAB-Partikel können vorwiegend an Dendriten und axonalen Terminalen unterschiedlicher Größe sowie an Gliazellen, welche die neuronalen Strukturen umgeben, beobachtet werden [Abb.54]. Hier liegen die DAB-Reaktionsprodukte in - teilweise dicht gepackten - Vesikeln (ca. 50 nm im Durchmesser) von axonalen Terminalen [Abb.54]. ANG I/II-IR pinozytische Vesikel (ca. 100 nm im Durchmesser) sind an dendritischen Zellmembranen zu erkennen, welche in Kontakt mit dem extrazellulären Raum stehen [Abb.54].

Weitere ANG I/II-IR lassen sich an axondendritischen Synapsen identifizieren. Die DAB-Ablagerungen sind vorwiegend, aber nicht ausschließlich, entlang der präsynaptischen Membran lokalisiert [Abb.54 und Abb.56A-B]. ANG I/II-IR Vesikel liegen in der präsynaptischen Region der axonalen Terminalen, wohingegen die Vesikel in der postsynaptischen Region überwiegend unmarkiert bleiben [Abb.56A-B].

Abb.54: ANG I/II-IR in axonalen Terminalen im SCN-Neuropil.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen unkontrastierten Ultradünnschnitt durch das SCN-Neuropil. Das Immunsignal ist hierbei in Vesikeln und an Zellmembranen zahlreicher, axonaler Terminalen lokalisiert (weiße Pfeile). Darüber hinaus ist eine ANG I/II-IR axondendritische Synapse zu identifizieren. Die DAB-Partikel liegen an der präsynaptischen Membran (weiße Pfeilspitze) unweit der markierten Vesikel. Die Abbildung zeigt des Weiteren einen von DAB-Partikeln markierten pinozytischen Vesikel in einem Dendriten mit Kontakt zum Extrazellulärraum (breiter, weißer Pfeil). Abkürzungen: wie zuvor; pV, pinozytischer Vesikel; S, Synapse. Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

Abb.55: ANG II-Bindungsstellen in axonalen Terminalen im SCN-Neuropil.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen unkontrastierten Ultradünnschnitt durch das SCN-Neuropil. Das DAB-Reaktionsprodukt färbt Zellmembranen und Vesikel (<50 nm im Durchmesser) in drei axonalen Terminalen (weiße Pfeile). AT₁-IR kann ebenfalls an den prä- und postsynaptischen Membranen einer axondendritischen Synapse identifiziert werden (weiße Pfeilspitze). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

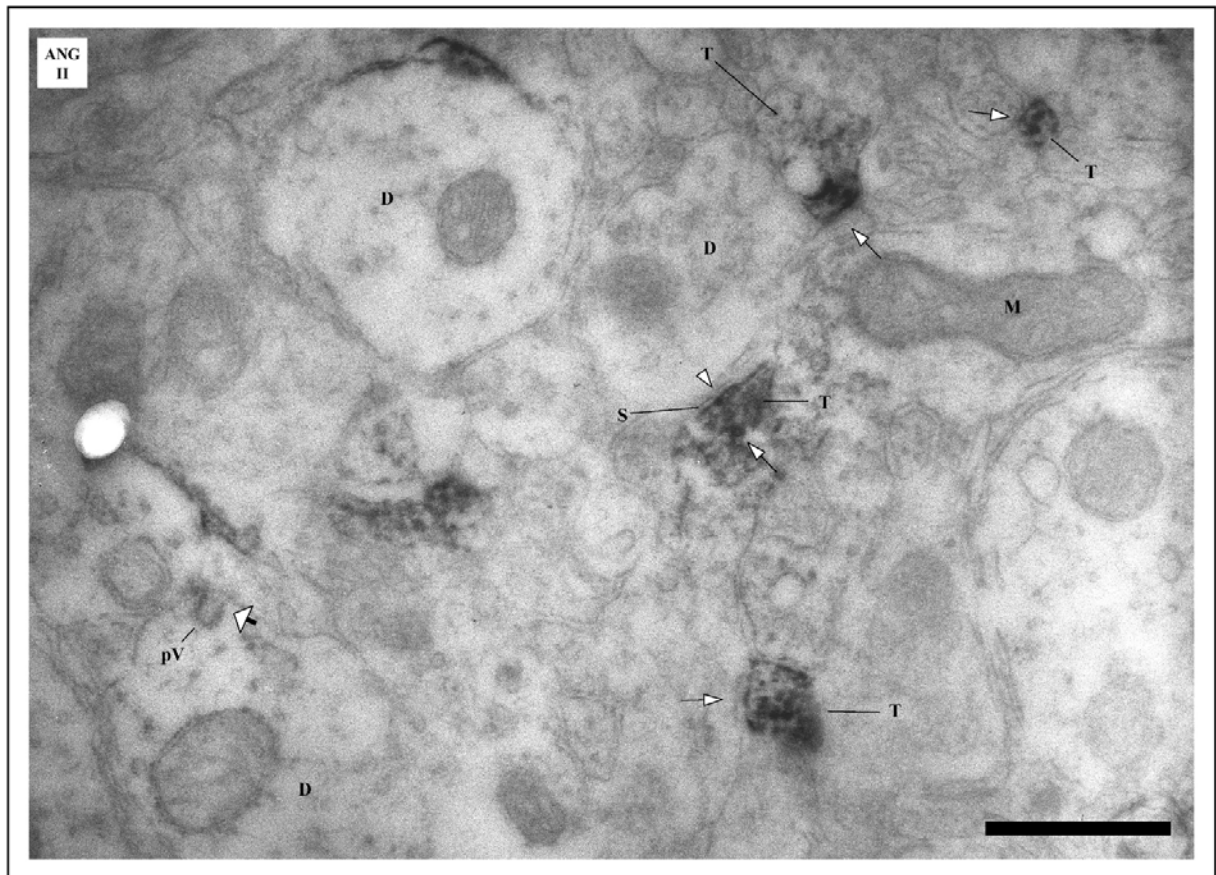


Abb.54:

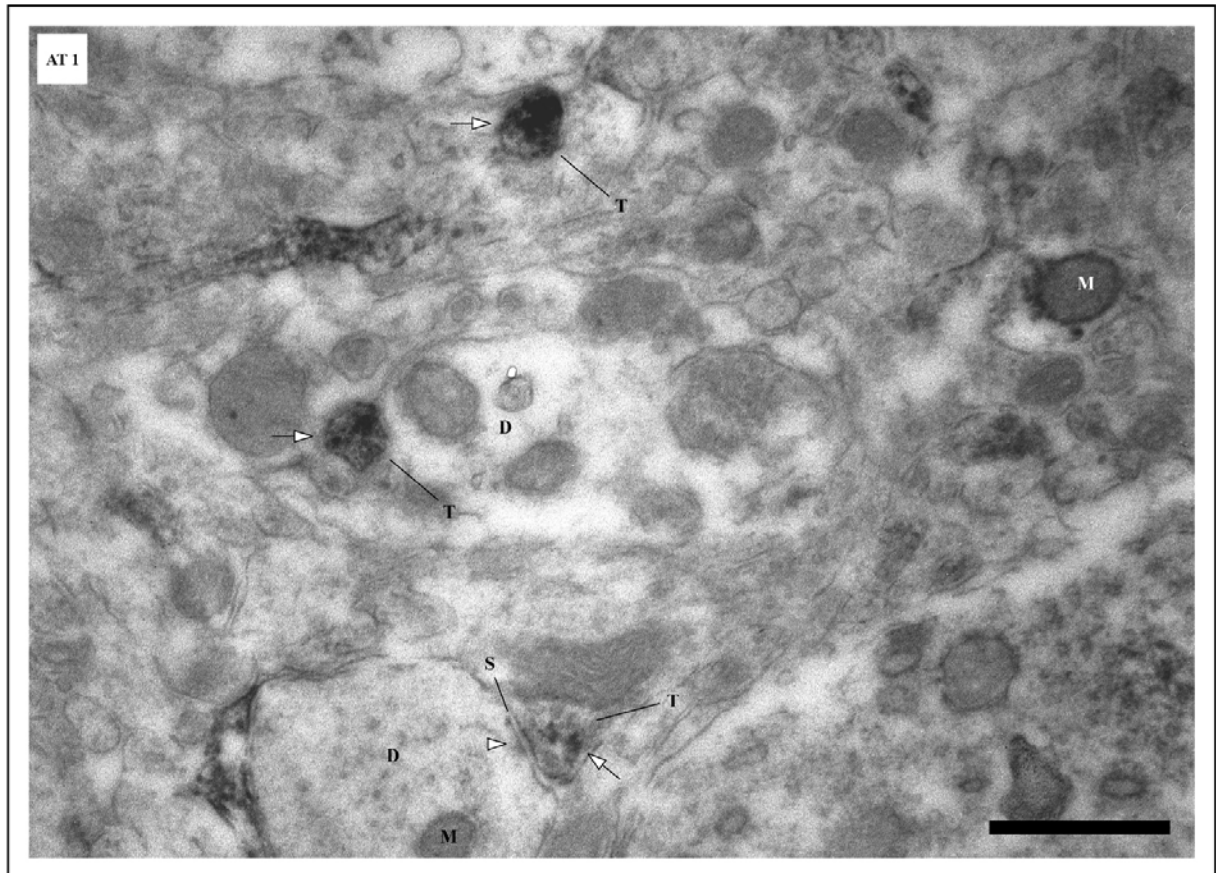


Abb.55:

Abb.56: ANG I/II-immunreaktive Synapsen im SCN-Neuropil.

Ein Vergleich zwischen doppelt kontrastierten und unkontrastierten Proben erlaubt eine Identifizierung der Immunsignale bei guter ultrastruktureller Orientierung. (A). Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastierten Ultradünnschnittes zeigt ein Feld von Dendriten und axonalen Terminalen im SCN-Neuropil und ermöglicht eine zuverlässige Differenzierung von Synapsen, unterschiedlich großen Vesikeln und Zellorganellen, wie Mitochondrien, in ihrer Umgebung. Die zuverlässige Abgrenzung elektronendichterer Strukturen von der eigentlichen DAB-Markierung wird im Falle der Synapsen durch die Doppelkontrastierung allerdings deutlich erschwert (weiße Pfeilspitzen in A). So ist selbst bei elektronischer Nachvergrößerung die Identifizierung der DAB-Ablagerungen an elektronendichteren synaptischen Membranen nicht einwandfrei möglich (weiße Pfeilspitzen in Ausschnitt von A). Die Identifizierung der ANG I/II-IR in Vesikeln wird zwar ebenfalls beeinträchtigt, ist aber bei kleineren Vesikeln (< 50 nm im Durchmesser) noch möglich (weiße Pfeile in A).

(B) Der unkontrastierte Nachbarschnitt von (A) erlaubt eine eindeutige Lokalisation des Immunsignals in seiner kontrastarmen Umgebung. Synapsen (weiße Pfeilspitzen in B) und Vesikel (weiße Pfeile in B), die auf dem kontrastierten Schnitt mehr oder weniger zu erahnen waren, sind hier, sofern sie nicht außerhalb der Schnittebene liegen, leicht zu bestimmen. In einigen Fällen sind die in (A) beobachteten Strukturen allerdings nicht mehr vollständig in der Schnittebene vorhanden. Hierdurch lassen sich die in (A) gezeigten Synapsen in (B) (gestrichelte Pfeilspitzen) und Vesikel (gestrichelte Pfeile) nur noch durch eine schwache Färbung schemenhaft lokalisieren. Selbst eine elektronische Nachvergrößerung zeigt nur noch die Spuren einer ANG I/II-immunreaktiven Synapse (gestrichelte Pfeilspitzen in Ausschnitt von B). Abkürzungen: wie zuvor; LV, große Vesikel (large vesikel); sV, kleine Vesikel (small vesikel). Balken entsprechen 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [127].

>

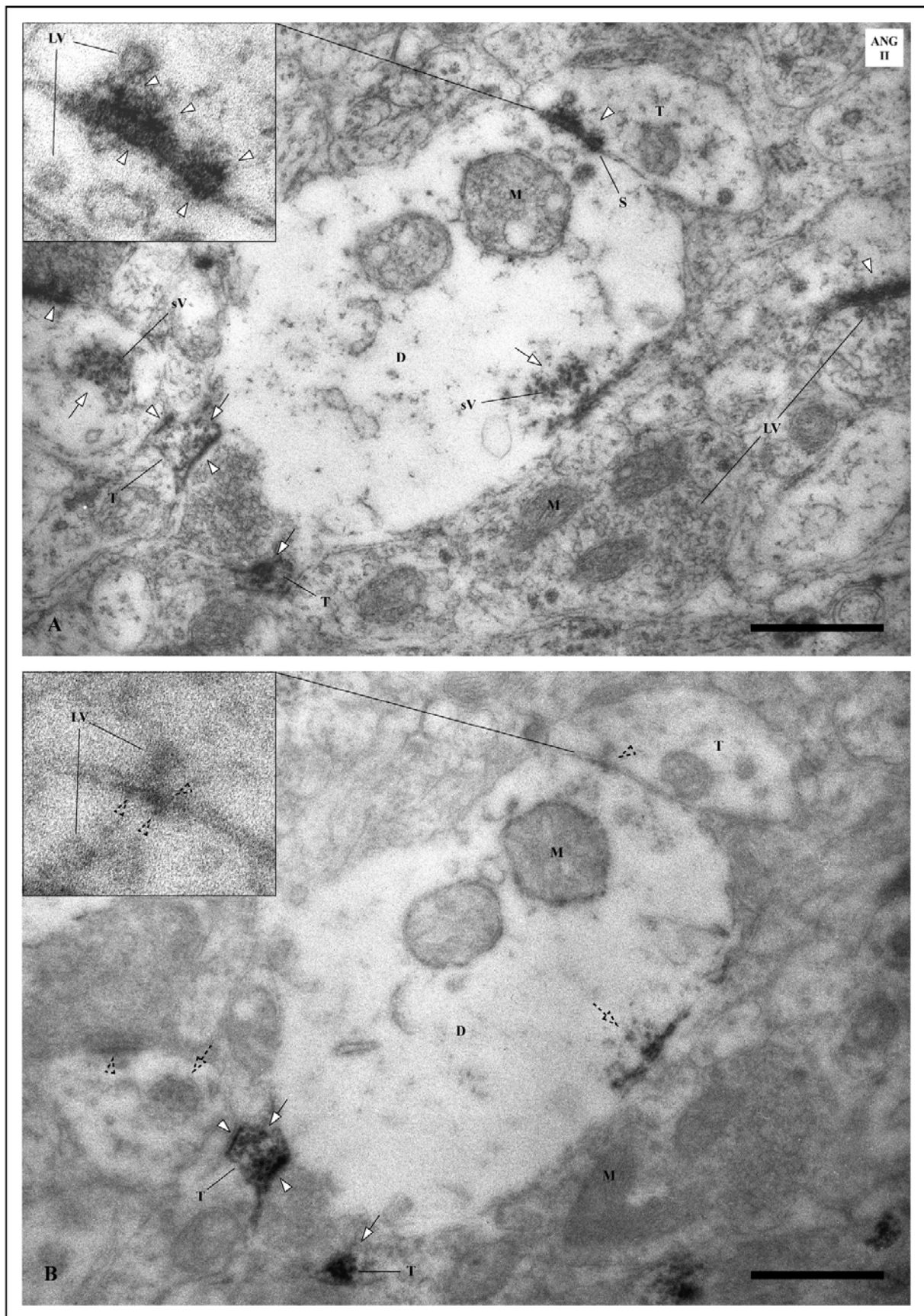


Abb.56:

IV.4.2.3 AT₁-Rezeptoren in axonalen Terminalen, Dendriten und Gliaelementen

Die subzelluläre Analyse bestätigt die Beobachtungen zur AT₁-IR auf lichtmikroskopischer Ebene. Das AT₁-IR-Vorkommen ist großteils beschränkt auf axonale Terminalen unterschiedlicher Größe sowie Dendriten und Gliafortsätze, welche die neuronalen Strukturen umgeben. DAB-Ablagerungen sind lokalisiert in - teilweise dicht gepackten - Vesikeln (ca. 50 nm im Durchmesser) von axonalen Terminalen und finden sich auch entlang der Zellmembranen von Gliaelementen und Dendriten wieder [Abb.55 und Abb.57A]. Weitere DAB-Partikel lassen sich auch an axondendritischen Synapsen identifizieren. Das Immunsignal liegt hier überwiegend an den präsynaptischen Zellmembranen und an Vesikeln (50-75 nm im Durchmesser) in der präsynaptischen Region [Abb.57B und Abb.58].

DAB-Färbungen sind besonders stark in unmyelinisierten varikösen Nervenfasern im dorsalen Bereich des SCN [Abb.59] und in dendritenähnlichen Strukturen im ventralen Bereich des SCN, nahe des *Chiasma opticum* [Abb.60]. In diesen varikösen Fasern sind große (> 75 nm im Durchmesser) und kleine Vesikel (< 50 nm im Durchmesser) durch DAB-Partikel markiert. Die größeren Vesikel sind von durchsichtigem Erscheinungsbild und nur an ihren Membranen gefärbt, während die kleineren Vesikel vollständig vom DAB-Reaktionsprodukt ausgefüllt werden [Abb.59A und Abb.60].

IV.4.2.4 AT₁-Rezeptoren in Neuronen

Im Gegensatz zur ANG I/II-IR ist die AT₁-IR an Zellkernen und Perikarya von SCN-Neuronen weniger stark ausgeprägt. AT₁-IR im nuklearen Plasma konnten nicht beobachtet werden, jedoch ließen sich DAB-Partikel an den äußeren Kernhüllen identifizieren [Abb.59B]. Innerhalb der neuronalen Perikarya ist die AT₁-IR vorwiegend an Vesikeln im Zytoplasma (ca. 50 nm im Durchmesser) lokalisiert. DAB-Ablagerungen lassen sich aber teilweise auch, wie schon in der ANG I/II-IR gesehen, an Mitochondrien identifizieren [Abb.59A].

Abb.57: ANG II-Bindungsstellen in neuronalen und glialen Strukturen im SCN-Neuropil.

(A) Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines unkontrastierten Ultradünnschnittes durch das zentrale SCN-Neuropil zeigt Axone, Dendriten und axonale Terminalen. DAB-Ablagerungen sind lokalisiert an Terminalen und dendritischen Zellmembranen (weiße Pfeile in A). Des Weiteren liegt das DAB-Reaktionsprodukt an zahlreichen Strukturen, welche Gliafortsätzen ähneln (offene Pfeile in A). (B) Eine Ausschnittsvergrößerung demonstriert AT₁-IR in Vesikeln einer Terminale (weißer Pfeil in B), sowie DAB-Markierungen an der präsynaptischen Membran einer Synapse (weiße Pfeilspitzen in B). Der Rahmen zeigt eine Region, welche in einer Ausschnittsvergrößerung in Abbildung 58 im Detail dargestellt ist. Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

Abb.58: ANG II-Bindungsstellen an Membranen von axondendritischen Synapsen im zentralen SCN-Neuropil.

Hoch vergrößerte Details von Abbildung 57 zeigen axondendritische Synapsen mit einer schwachen DAB-Markierung. Eine elektronische Nachvergrößerung demonstriert AT₁-IR an der präsynaptischen Membran (weiße Pfeilspitzen in Ausschnittsvergrößerung) in der direkten Nachbarschaft zu immunreaktiven Vesikeln (weißer Pfeil in Ausschnittsvergrößerung) in der präsynaptischen Region. Abkürzungen: wie zuvor, posA, postsynaptische Region (area); prsA, präsynaptische Region (area). Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

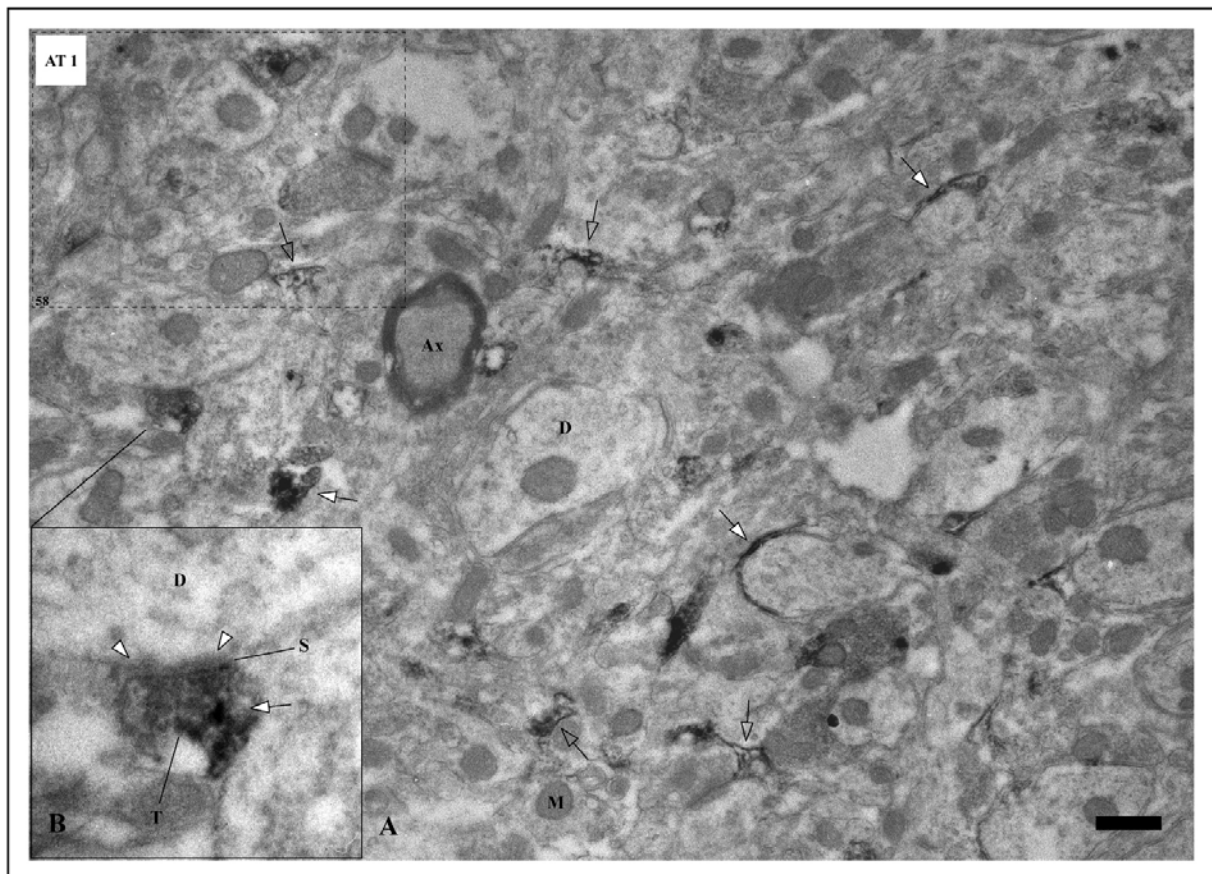


Abb.57:

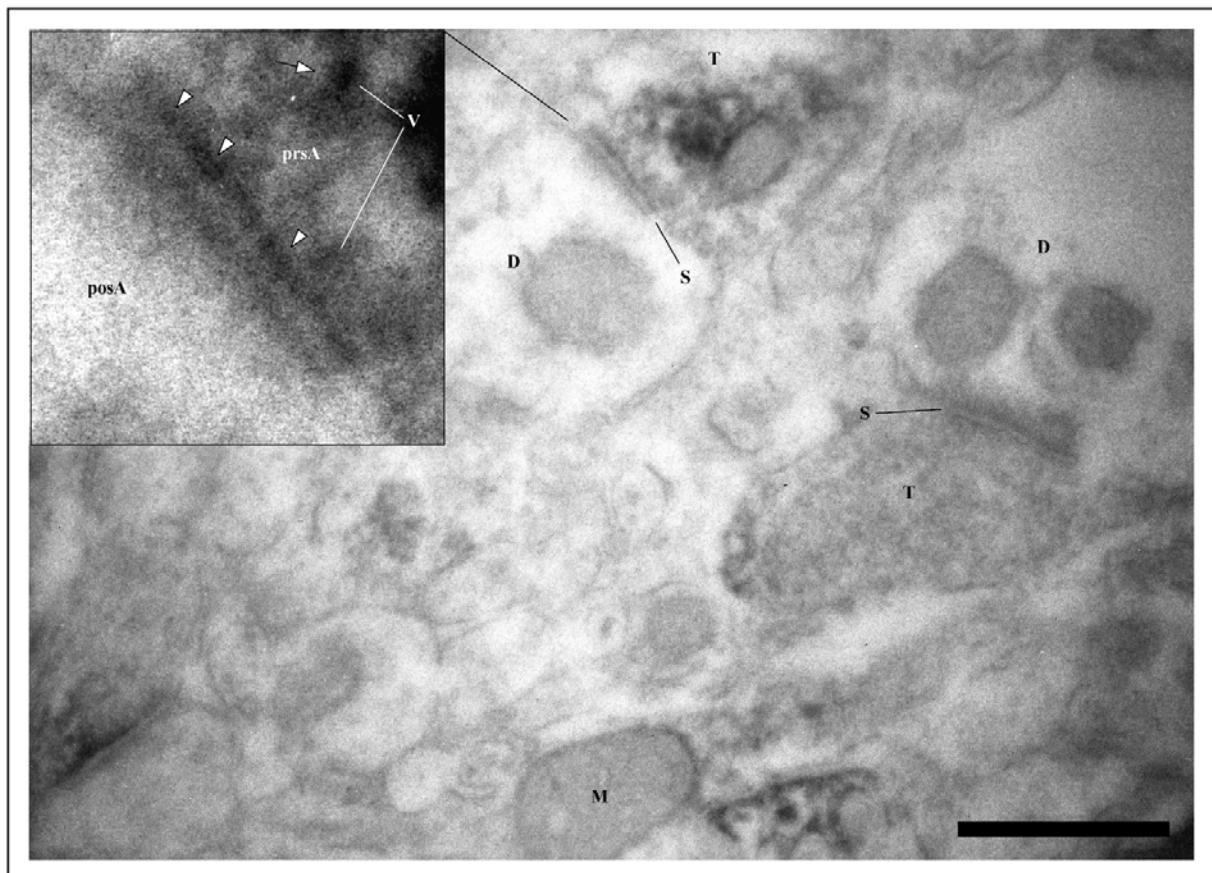


Abb.58:

Abb.59: Lokalisation von AT₁-Rezeptoren in varikösen Fasern im dorsalen SCN-Neuropil, der Schale.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch die dorsale Schalenregion des SCN. Eine immunreaktive, variköse Faser verläuft zwischen zwei Perikarya durch die Schalenregion des SCN-Neuropils. DAB-Ablagerungen bedecken kleine - teils zu Clustern geformte - kleine Vesikel (< 50 nm im Durchmesser) fast vollständig (weiße Pfeile in A). Große, durchsichtige Vesikel (> 75 nm im Durchmesser) sind an ihren Membranen von DAB-Partikeln gesäumt (breite weiße Pfeile in A). (B) Eine Ausschnittsvergrößerung aus (A) zeigt AT₁-IR an der äußeren Kernmembran eines Neurons (breiter schwarzer Pfeil in B). Weitere DAB-Reaktionsprodukte sind an Vesikeln im Zytosol nahe der markierten Kernhülle sichtbar (weißer Pfeil in B). Abkürzungen: wie zuvor; vF, variköse Faser. Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

Abb.60: Massive AT₁-IR in neuronalen Strukturen im ventralen SCN-Neuropil

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch den ventralen Rand des SCN-Neuropils zeigt massive DAB-Ablagerungen in einer mit Vesikeln unterschiedlicher Größe gefüllten, dendritenähnlichen Struktur nahe eines Perikaryons. Kleine Vesikel (< 50 nm im Durchmesser) sind vollständig von DAB-Partikeln bedeckt (weiße Pfeile), während große, durchsichtige Vesikel (> 75 nm im Durchmesser) an ihren Membranen von DAB-Ablagerungen gesäumt sind (breite weiße Pfeile). Abkürzungen: wie zuvor. Balken entspricht 0,5 µm. Abbildung verändert nach M.A. Thomas, 2004 [128].

>

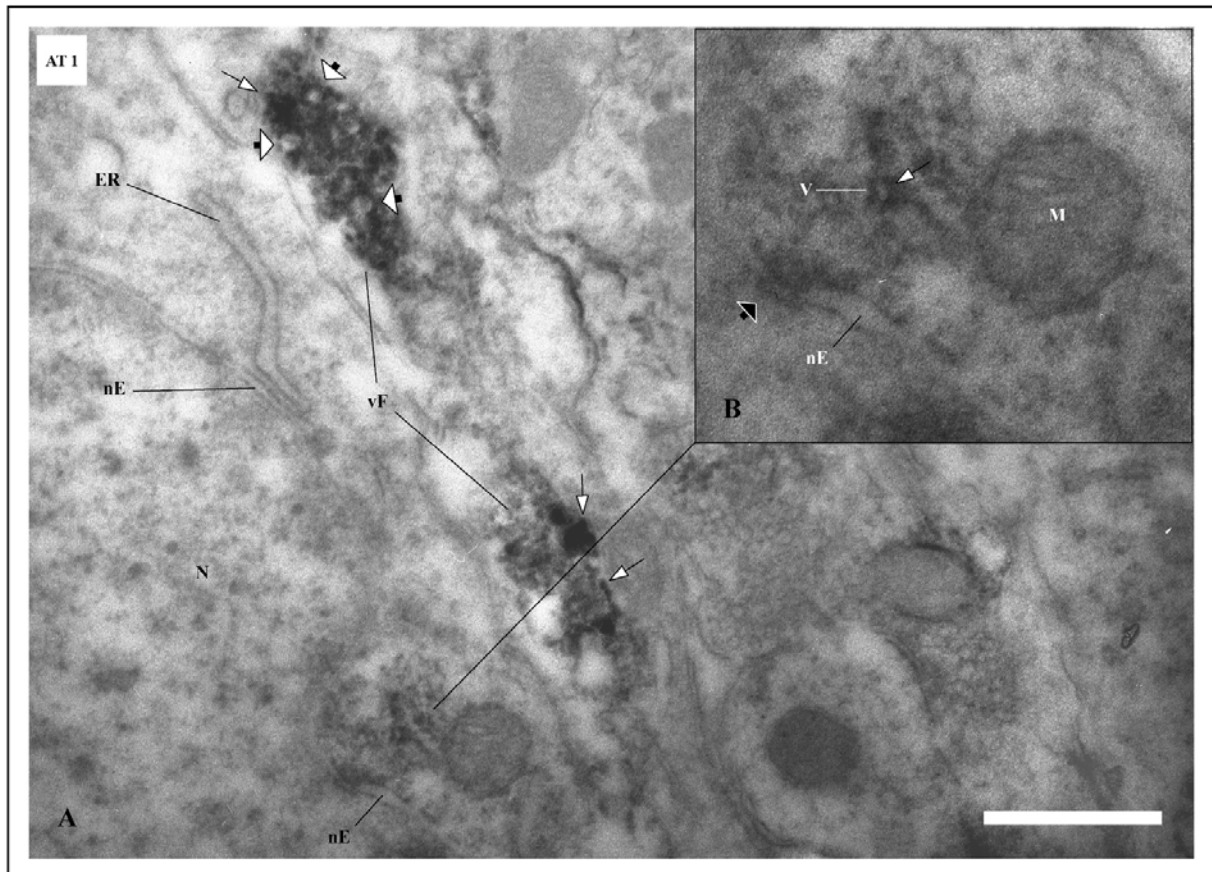


Abb.59:

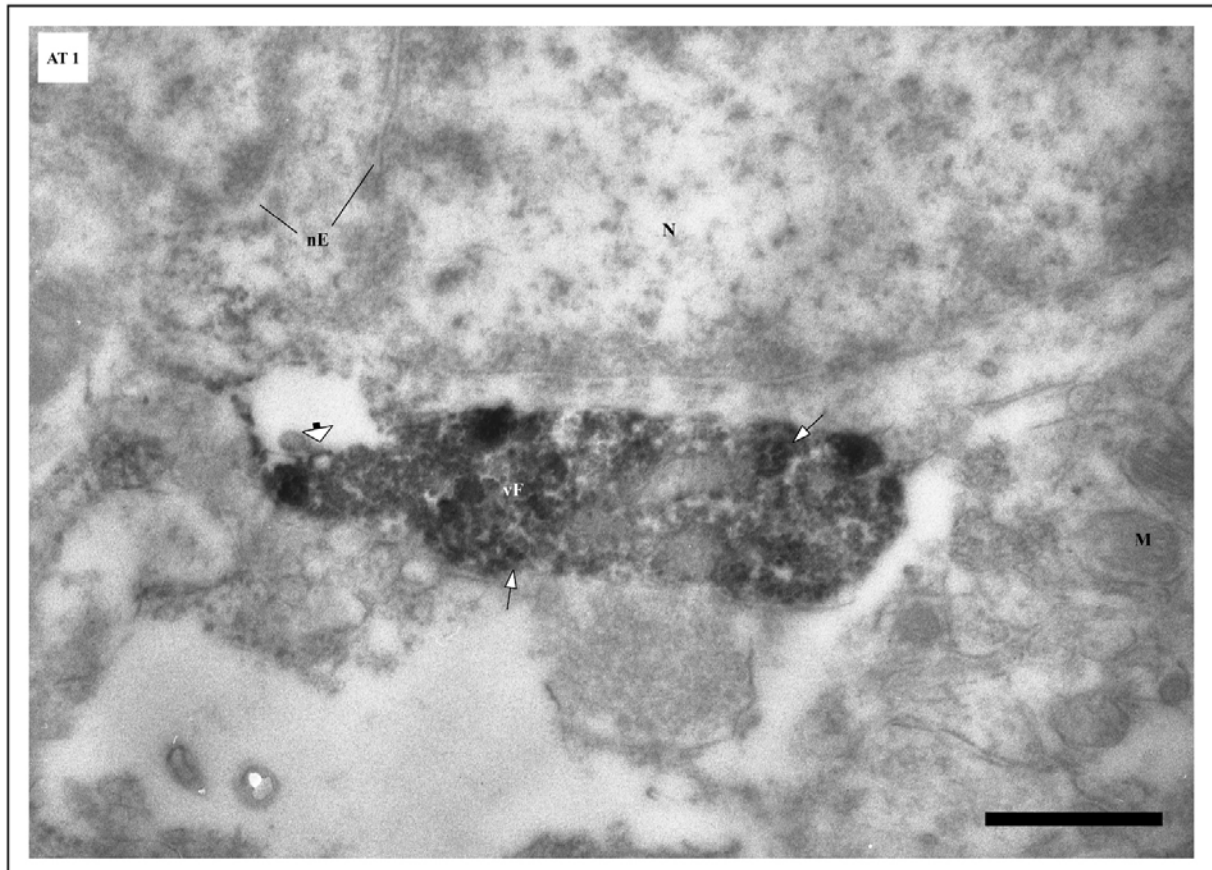


Abb.60:

V. DISKUSSION

V.1 Diskussion der Methode unter Berücksichtigung alternativer Techniken

V.1.1 Die Immunhistologie ist eine notwendige Ergänzung zu autoradiographischen- und Ligand-Bindungs-Studien

Einige der in dieser Arbeit immunhistologisch untersuchten Kerngebiete (OvLT, SFO und SCN) waren Ziele früherer Untersuchungen zur Lokalisation von ANG II und seines AT₁-Rezeptors mittels Autoradiographie und Ligand-Bindungs-Studien. Diesen Techniken ist gemein, dass ihre räumliche Auflösung - methodenbedingt - äußerst begrenzt und somit die Differenzierung der AT₁-Rezeptortragenden Strukturen im SCN (z.B. zwischen Kapillaren und Neurone) nicht möglich ist. So können Ligand-Bindungsstudien zwar die Rezeptorquantität in einem untersuchten Kerngebiet ermitteln, sind aber nicht in der Lage zwischen verschiedenen Zellstrukturen (z.B. Neurone, Glia- und Endothelzellen) und deren unterschiedlichen Quantitäten an Rezeptoren zu differenzieren. Dies kann in erheblichen Fehlern bzw. Ungenauigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse führen und lässt sich auf fast alle der hier untersuchten Kerngebiete übertragen. So werden z.B. MnPO, OvLT, PVN, SFO, SON von zahlreichen Blutgefäßen unterschiedlicher AT₁-IR durchzogen. Diese können mittels Autoradiographie oder Ligand-Bindung jedoch nicht vom umliegenden Parenchym isoliert betrachtet werden und beeinflussen somit maßgeblich die Ergebnisse dieser Techniken.

Die hier vorgestellten immunhistologischen Ergebnisse zeigen, dass sowohl die zelluläre Zusammensetzung, als auch die Immunreaktivität in unterschiedlichen Regionen eines Kerngebietes (z.B. Übergangs- und Zentralregionen des SFO) ausgesprochen variabel ist und machen somit deutlich, wie wichtig eine exakte räumliche Auflösung der untersuchten Strukturen ist. Immunhistologie auf lichtmikroskopischer Ebene kann hier also durch gute räumliche Auflösung der immunreaktiven Strukturen unverzichtbare Dienste bei der Verifizierung und Differenzierung der zu untersuchenden Parameter leisten.

Zwar ist eine Quantifizierung der AT₁-Rezeptoren mittels lichtmikroskopischer Immunhistologie im Gegensatz zur Ligand-Bindungstechnik nur schwer möglich, jedoch kann die Immunhistologie im Einzelfall im Gegensatz zu Rezeptor-Bindungsstudien den Ort der Immunreaktion bis auf die zelluläre Ebene zeigen. Eine Erweiterung der immunhistologischen Untersuchungen auf die ultrastrukturelle Ebene ermöglicht dann die Erfassung des Immunsignals auf subzellulärer Ebene und gewährleistet darüber hinaus die eindeutige Identifizierung verschiedener Zelltypen und deren etwaige morphologische Veränderungen.

Hiermit können die bereits durch andere Methoden gewonnenen Erkenntnisse verifiziert und erweitert werden, was eventuell zu einer Neubewertung schon bestehender Forschungsergebnisse führt.

Bei dem später vorgestellten Vergleich der immunhistologisch erzielten Ergebnisse mit den Befunden aus autoradiographischen und Ligand-Bindungs-Studien müssen jedoch einige Parameter berücksichtigt werden, die in einer Divergenz der Ergebnisse resultieren können.

1. Die in der Immunhistologie verwendeten Antikörper entsprechen in ihren Charakteristika selten jenen, die in anderen Methoden Verwendung finden.
2. Das zu untersuchende Gewebe wird unterschiedlichen Vorbehandlungen unterzogen (z.B. Fixierung, Schnittdicke, Probengröße).
3. Während der immunhistologischen ‚Färbeprozesses‘ werden die Proben Behandlungen unterzogen, die sich von denen anderer Methoden unterscheiden.

V.1.2 Die notwendige Korrelation von LM und TEM beeinflusst die Wahl der Färbetechnik

Nach dem heutigen Stand der Technik gibt es zur Markierung der Antigen/Antikörperreaktion auf ultrastruktureller Ebene die Wahl zwischen kolloidalen Goldpartikeln und Standard-Peroxidasesubstraten, wie z.B. DAB. Bei näherer Betrachtung der Problemstellung werden einige Nachteile der Goldpartikel sichtbar. Die geringe Eindringtiefe der Goldpartikel für glutaraldehydfixiertes Gewebe führt, sobald mit ‚*pre-embedding*‘ Färbetechniken an relativ dicken Schnitten (30-50 µm) gearbeitet werden muss, unweigerlich zum Gebrauch von sehr kleinen Goldkügelchen (< 10 nm) [133]. Um derart kleines Gold im Lichtmikroskop sichtbar zu machen, sind Intensivierungsmaßnahmen (z.B. durch Silberverstärkungen) nötig [133], was den Zeit- und Materialaufwand in die Höhe treibt. Die Alternative zur ‚*pre-embedding*‘ Technik, das sog. ‚*on-section post-embedding*‘ verspricht nur dann Erfolg, wenn das zu untersuchende Areal bereits bekannt, bzw. klein genug ist, damit auf eine großflächigere Orientierung und Analyse auf lichtmikroskopischer Ebene verzichtet werden kann. Hinzu kommt, dass hierbei eine ausreichende Anzahl von Antigenen an der Oberfläche der Kunstharzschnitte vorhanden sein muss, da die Goldpartikel über keine nennenswerte Eindringtiefe in den Kunstharz verfügen.

Die Aufgabenstellung, nämlich die immunhistologische Forschung im RAS des Hypothalamus der Ratte resultiert in einer großen Anzahl an Proben. Des Weiteren führt die Analyse von intra- und extrazellulären Transportmechanismen von ANG II zwischen interessanten Strukturen zu relativ großen Zielgebieten, welche lichtmikroskopisch interpretiert werden müssen, um die Zielgebiete für die Elektronenmikroskopie festzulegen.

Demzufolge, war das Ziel dieser Studie eine leicht reproduzierbare licht- und elektronenmikroskopische Färbetechnik zu entwickeln und zur erfolgreichen Anwendung zu bringen. Die Methode sollte insbesondere eine schnelle Verknüpfung lichtmikroskopisch analysierter Areale mit elektronenmikroskopisch interessanten Regionen ermöglichen. Unter diesen Voraussetzungen schied die Verwendung von Goldpartikeln als Markierung aus und eine konventionelle Strategie wurde gewählt. Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) erschien in Kombination mit dem klassischen Substrat der Immunhistologie, DAB, auch für die Immunhistologie auf ultrastruktureller Ebene als die Technik der Wahl.

V.1.3 Grenzen der Immunhistologie auf elektronenmikroskopischer Ebene

Immunhistologische Methoden sind immer durch die technischen Möglichkeiten begrenzt. Adäquate strukturelle Erhaltung, kombiniert mit gut konservierten Antigenen und ausreichender Durchdringung der Antikörper und Marker, sind für jede immunhistologische Studie eine Voraussetzung.

Neben ihren Vorzügen besitzt die hier angewandte immunhistologische Methode, wie jede andere Technik auch, einige Einschränkungen, die bei der Interpretation der elektronenmikroskopischen Ergebnisse immer zu berücksichtigen sind.

V.1.3.1 Perfusion und Fixierung sowie Konjugation der Antikörper

Ein entscheidendes Charakteristikum eines Antikörpers ist seine Konjugation zum verwendeten Fixativ. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind von Seiten des Herstellers formaldehydkonjugiert, d.h. der Hauptbestandteil des Fixativs musste ebenfalls formaldehydbasierend sein. Das zur Verfügung stehenden Fixativ Paraformaldehyd, welches sich problemlos in Paraffineingebetteten Gewebe anwenden lässt, ist für die Immunhistologie auf elektronenmikroskopischer Ebene allerdings unbrauchbar. Deswegen wurde es mit verschiedenen anderen Fixativen gemischt, die eine zufrieden stellende ultrastrukturelle Erhaltung der Proben gewährleisten und in kleineren Konzentrationen eine adäquate Antigen/Antikörper-Reaktion erlauben.

Die Kombination von 4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd und 0,2% Pikrinsäure konserviert sowohl Antikörperbindungsstellen³² als auch ultrastrukturelle Details.

³² Eine Beeinträchtigung der Antikörperbindungsstellen durch das Fixativ kann nie ausgeschlossen werden. Unterschiedliche Fixative bedingen wahrscheinlich immer eine Variabilität der Immunsignale, so dass bei der Interpretation verschiedener immunhistologischen Arbeiten immer das gewählte Fixativ zu berücksichtigen ist.

V.1.3.2 Spezifität des AT₁-Rezeptorantikörpers

Neben der Konjugation ist die Spezifität die wichtigste Eigenschaft des Antikörpers. Viele Hersteller bieten zahlreiche in der Immunhistologie nutzbare Antikörper gegen den AT₁-Rezeptor an. Die verfügbaren Antikörper gegen den AT₁-Rezeptor sind alle polyklonal und meist gegen den extrazellulären N-Terminus des transmembranen Rezeptors gerichtet. Nur wenige Antikörper reagieren mit dem intrazellulären C-Terminus des Rezeptors. Allen angebotenen AT₁-Rezeptorantikörpern ist gemein, dass sie nicht kreuzreaktiv mit AT₂-Rezeptorantigenen sind.

Der hier verwendete AT₁-Rezeptorantikörper durchlief vor seinem Einsatz einen unabhängigen Test (*Western-Blot*), der keine Abweichungen in der vom Hersteller angegebenen Spezifität erkennen ließ [23]. Des Weiteren wurde der Antikörper sowohl Positiv-, als auch Negativkontrollen unterzogen. In den negativen Kontrollexperimenten wurde der 1. Antikörper in der Färbeprozedur weggelassen um unspezifische Immunreaktionen durch den 2. Antikörper zu identifizieren. Darüber hinaus kam in weiteren Kontrollexperimenten ein vom Hersteller des Antikörpers entwickeltes Peptid zum Einsatz, das die Antigen/Antikörperreaktion erfolgreich unterbinden konnte (*Blocking-peptide*).

Positivkontrollen in verschiedenen Hirnregionen konnten große, aber keine vollständigen Übereinstimmungen mit den bereits bekannten Lokalisationen des AT₁-Rezeptors durch andere AT₁-Rezeptorantikörper bei Ratten aufzeigen, d.h. es gibt Analogien aber keine hundertprozentige Deckungsgleichheit [31, 32, 59]. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass nur wenige Studien überhaupt einen direkten Vergleich der Ergebnisse auf zellulärer bzw. subzellulärer Ebene zulassen. Dieser ist jedoch zum einen durch die Verwendung verschiedener Rattenstämme, zum anderen durch unterschiedliche immunhistologische Methoden restriktiert (z.B. Fixierung, Einbettmedien, Schnittdicke, Art der Permeabilisierung). Des Weiteren sind weder das Alter der zu vergleichenden Ratten, noch ihre Haltungsbedingungen und die Tageszeit ihrer Tötung deckungsgleich mit den hier verwendeten Tieren. Ob die Parameter Alter, Haltung und Tötungszeitpunkt eine Rolle für die Lokalisation des Octapeptids und seiner Rezeptoren spielen ist momentan nicht erwiesen, sollte aber bedacht werden.

Eine übergreifende Studie zu verschiedenen Antikörper (industrieller und privater Herkunft) bei normotensiven Sprague-Dawley Ratten unter kontrollierten, bzw. vergleichbaren Bedingungen ist zurzeit nicht verfügbar. Eine zusätzliche Divergenz der Ergebnisse durch

unterschiedliche Charakteristika verschiedener Antikörper erscheint jedoch sehr wahrscheinlich³³.

V.1.3.3 Spezifität des ANG I/II-Antikörpers

Der ANG I/II-Antikörper unterlief die gleichen Kontrollexperimente wie der AT₁-Rezeptorantikörper. Das heißt, es wurden sowohl Positiv- und Negativkontrollen, als auch Tests mit dem zur Verfügung stehenden ‚*Blocking peptide*‘ durchgeführt. Negativkontrollen sowie die Blockierung der Antigen/Antikörper-Reaktion konnten erfolgreich durchgeführt werden.

Der Vergleich der Positivkontrollen mit Ergebnissen aus immunhistologischen Studien mit anderen ANG II-Antikörpern hingegen, erwies sich als schwierig. Neben den privat produzierten Antikörpern, war die Anzahl der industriell hergestellten und somit frei verfügbaren Antikörper gegen ANG II zu Beginn dieser Arbeit auf drei Produkte begrenzt. Mittlerweile ist sie auf ein industrielles Produkt, nämlich den hier verwendeten Antikörper geschrumpft. Ein Grund hierfür ist mit Sicherheit die problematische Interpretation der Ergebnisse, die aus der immunhistologischen Anwendung der Antikörper resultieren. Allen existierenden (d.h. veröffentlichten) Antikörpern gegen ANG II (industriell und privat hergestellt) ist gemein, dass sie niemals nur gegen ANG II alleine gerichtet sind, sondern vielmehr auch mit seinem Vorläufer ANG I (ANG I/II-Antikörper) oder mit dem ANG II-Derivat ANG III reagieren. Dies behindert die Interpretation der Ergebnisse natürlich maßgeblich und verkompliziert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Der hier verwendete ANG I/II-Antikörper ist gegen das menschliche ANG I gerichtet und somit kreuzreaktiv mit ANG II und seinem Vorläufer ANG I. Immunreaktionen gegen das Octapeptid ANG II sind deswegen schwierig von den Reaktionen gegen das Decapeptid ANG I abzugrenzen. Darüber hinaus wird die Interpretation der Lokalisationsuntersuchung zur ANG II-Immunreaktivität durch die Tatsache erschwert, dass eine biochemische Identifizierung und Differenzierung der beiden kurzkettigen Angiotensinogenderivate mit Hilfe der sonst üblichen Methode dem *Western-Blot*³⁴ nicht möglich ist.

Aus der subzellulären Lokalisation der ANG I/II- und AT₁-IR ergeben sich jedoch Möglichkeiten die Frage nach der eigentlichen ANG II-Immunreaktion zu beantworten. Die Lokalisation der ANG I/II- und AT₁-Immunreaktionen ist an vielen Zellmembranen und

³³ Eine vergleichende Untersuchung zwischen einem auf den N-Terminus gerichteten Antikörper mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper (selber Hersteller) befindet sich bereits in der Testphase.

³⁴ Der als Spezifikations-test für Proteine angewandte ‚*Western-Blot*‘ erfasst regulär nur das langkettige Ausgangsprodukt der beiden Angiotensine, nämlich Angiotensinogen. Rückschlüsse auf die Spezifität der produzierten Antikörper gegen das Octa- bzw. das Decapeptid sind demnach nicht möglich.

membranebundenen Organellen in diversen Zelltypen im Gehirn eng miteinander korreliert, d.h. sie tritt kolokalisiert auf. Da das Decapeptid ANG I in physiologisch relevanten Dosen jedoch nicht an den AT₁-Rezeptor bindet, ist zu vermuten, dass ein Großteil der in Neuronen, Glia-, Ependym- und Endothelzellen lokalisierten ANG I/II-IR wahrscheinlich nur ANG II-IR darstellt [98].

Unterstützt wird diese Theorie durch die gängige Modellvorstellung, dass sich innerhalb der Gliazellen und Neurone nur Angiotensinogen, ANG II und seine Derivate, aber nicht sein Vorläufer ANG I, in relevanten Mengen nachweisen lassen [siehe auch Abb. 6]. Das spricht dafür, dass keine oder nur wenige Immunsignale innerhalb von Gliazellen und Neuronen auf Reaktionen mit dem ANG II-Vorläufer ANG I zurück zuführen sind. Zwar wäre eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Angiotensinogen selbst - in dem Bestandteile von ANG I und ANG II enthalten sind - denkbar, die enge Kolokalisation mit dem AT₁-Immunsignal auf subzellulärer Ebene spricht jedoch für eine spezifische ANG II-Färbung in Neuronen und Gliazellen.

V.1.3.4 Diffusion des Substrats DAB

Ein bekanntes Problem der Peroxidase-Reaktion ist die Tatsache, dass ihr Reaktionsprodukt sich nicht nur an dem subzellulären Ort niederschlägt an dem das Peroxidaseenzym immunzytochemisch gekoppelt ist, sondern auch in der direkten Umgebung des Enzyms [133]. Bei der subzellulären Lokalisation des Peroxidase-Reaktionsproduktes - in diesem Falle DAB - muss demzufolge berücksichtigt werden, dass DAB-Partikel über die Grenzen der eigentlichen Reaktion (z.B. an Vesikelmembranen) hinaus anzutreffen sind.

Des Weiteren, muss in Betracht gezogen werden, dass DAB innerhalb des Gewebes vom Ort der enzymatischen Reaktion in benachbarte Regionen diffundiert [78]. So kann beispielsweise das flockige Erscheinungsbild des DAB-Niederschlags an Mitochondrien von Neuronen, Glia- und Endothelzellen auf eine DAB-Diffusion zurück zuführen sein.

Eine weitere Fehlerquelle in der Interpretation subzellulärer Lokalisationen mittels DAB liegt in der Existenz von endogenen Peroxidasen, die das Substrat DAB oxidieren können. So konnte beispielsweise für Hämoglobin in Erythrozyten ein DAB-Oxidationsvermögen nachgewiesen werden [78]. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass DAB von Erythrozyten oxidiert und von benachbarten Endothelien der Blutgefäßwände aufgenommen wird. Eine ausreichende Perfusion des Zielgebietes sollte jedoch selbst die kleinsten Kapillaren von Erythrozyten befreien. Gefäße mit zurückgebliebenen Blutkörperchen sind auf lichtmikroskopischer Ebene einfach zu identifizieren und können demnach umgangen werden.

Neben dem Hämoglobin in Erythrozyten sind weitere zelluläre Komponenten bekannt, die die Fähigkeit zur DAB-Oxidation besitzen. So verfügen einige Zellorganellen über endogene Peroxidaseelemente (z.B. das endoplasmatische Retikulum) [78]. Diese endogenen Peroxidasen können allerdings vor der eigentlichen Immunreaktion durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid blockiert werden.

V.1.3.5 Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen / Wahl der Schnittdicke

Die Notwendigkeit die Permeabilität von Zellmembranen bis zu einem gewissen Grad zu erhöhen um eine genügende Immunreaktion zu erhalten, führt zu einem weiteren Problem. Das ‚Aufbrechen‘ von Membrankompartimenten kann unter Umständen zur Freisetzung von Antigenen aus ihrer ursprünglichen Position führen und damit die subzellulären Details verfälschen [80, 93]. ‚Schockgefrieren‘ in flüssigem Stickstoff erscheint hier als eine verlässliche Methode zur Erhöhung der Permeabilität. Im Vergleich mit Triton oder Saponin ist die Erhaltung der Antikörper-Bindungsstellen sowie der ultrastrukturellen Details zufrieden stellend und eine ausreichende Durchdringung mit Antikörper und Marker ist gegeben.

Darüber hinaus ist die Schnittdicke maßgeblich für eine vollständige Durchdringung der Probe mit Antikörper und Marker. Nach eigenen Erfahrungswerten ist die Eindringtiefe von Antikörper und Marker in fixiertem Gewebe auf 20µm begrenzt. Bei dem hier verwendeten ‚freischwimmenden Verfahren‘ dürfen die Proben eine Schnittdicke von 40µm also nicht überschreiten, um von beiden Seiten bis zur Mitte hin vollständig durchdrungen zu werden. Eine Reduktion der Schnittdicke auf beispielsweise 20 µm wäre für eine bessere Durchdringung natürlich von Vorteil gewesen. Die von ihrer Konsistenz her recht weichen Gehirnproben ließen ohne eine zusätzliche Einbettung in ein Stützmedium jedoch keine wesentlich dünneren Schnitte als 40 µm zu³⁵.

V.1.3.6 Kontrastverstärkungen

Die Verwendung des klassischen Substrats DAB anstelle von Goldpartikeln war ein zentraler Teil dieser Studie. Trotz der Verstärkung der DAB-Färbung durch Osmiumtetroxid erfordert die alleinige Markierung mit DAB Ultradünnschnitte mit geringem Kontrast. Eine zusätzliche Kontrastverstärkung mit Uranylazetat und Bleizitrat kommt deswegen ohne eine weitere

³⁵ Mit Glutaraldehyd fixierte Gehirnproben ließen sich mit dem zu Verfügung stehenden Vibratom ohne Probleme auf bis zu 20 µm dünn schneiden. Im Gegensatz zu den weicheren Gehirnproben für die Immunhistologie waren die zur reinen elektronenmikroskopischen Orientierung angefertigten Gehirnproben von Hartgummi ähnlicher Konsistenz.

Intensivierung des Immunsignals (z.B. durch Silberverstärkungen) nicht in Betracht. Die Kontrastierung eines jeden zweiten Schnittes gewährleistet eine ausreichende Identifizierung der subzellulären Details während sich der Informationsgehalt des Immunsignals unverdeckt auf den nicht kontrastierten Nachbarschnitten analysieren lässt. Der auf der Distanz zwischen zwei unkontrastierten Schnitten (60-70 nm) beruhende Verlust an Information ist tolerabel.

V.1.4 Ausblick und Erweiterung der Methode:

Nähere Aufschlüsse über den aktiven Transport von ANG II durch das Ependym der Hirnventrikel sowie durch das Endothel von Gehirnkapillaren könnte eine Tanninsäurebehandlung bringen, mit deren Hilfe sich Exozytoseprozesse, bzw. deren Produkte konservieren ließen [13]. Darüber hinaus erscheint eine Doppelmarkierung des Octapeptids und seiner AT₁-Rezeptoren auf ein und demselben Ultradünnschnitt mittels DAB und Goldpartikeln zur Identifikation des Hormon/Rezeptor-Komplexes zwingend notwendig.

V.2 Lokalisation von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im Hypothalamus und angrenzenden Arealen von normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene

V.2.1 Lichtmikroskopische Lokalisation von AT₁-Rezeptoren

In der hier vorliegenden Arbeit gelang erstmalig ein Vergleich der AT₁-Rezeptor-Immunreaktivität in Kerngebieten der AV3V, den lateralen Hirnventrikeln sowie des SCN zwischen normotensiven Sprague-Dawley (SDR) und transgen-hypertensiven TGR(mREN2)27 (TGR) Ratten. Mittels lichtmikroskopischer Immunhistologie konnten im *Organum vasculosum lamina terminalis* (OvLT), im *Organum subfornicale* (SFO), im *Plexus choroideus* (ChP) und in ausgesuchten Regionen am Ependym der lateralen Ventrikel Unterschiede in der AT₁-Rezeptor-Immunreaktivität zwischen normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten auf zellulärer Ebene sichtbar gemacht werden. Des Weiteren gelang die erstmalige Darstellung von AT₁-IR im *Nucleus supraquiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus von normotensiven SDR und transgen-hypertensiven TGR. Darüber hinaus konnten bisher unbekannte AT₁-immunreaktive Tanyzyten in der retrochiasmatischen Region von SDR beschrieben werden.

Insgesamt entsprechen die hier beschriebenen Beobachtungen zur AT₁-IR im Gehirn von SDR in ihrer Lage und in der Qualität der Immunreaktion den wenigen immunhistologischen Befunden, die bei Wistar Kyoto³⁶ [87] und SDR vorliegen [31, 89]. Diese Studien sind

³⁶ Befunde variieren innerhalb der stamesspezifischen Unterschiede.

teilweise jedoch auf wenige Kerngebiete in der AV3V und im Hypothalamus begrenzt, so dass wichtige Areale, wie das OvLT, das SFO und der SCN nicht bearbeitet wurden oder demonstrieren die hier dargestellten Kerngebiete in unzureichender lichtmikroskopischer Auflösung.

Die AT₁-immunreaktiven Kerngebiete im Hypothalamus und angrenzenden Arealen sind in ihrer Lage in weiten Teilen deckungsgleich mit den autoradiographischen Beobachtungen und Ligand-Bindungsstudien in Ratten [2, 30, 44, 79, 118, 119] und Mäusen [49]. Im Gegensatz zu diesen Studien zeigt die hier verwendete Immunhistologie auf lichtmikroskopischer Ebene die untersuchten Areale aber in einer höheren räumlichen Auflösung, was eine Differenzierung einzelner Regionen innerhalb der Kerngebiete ermöglicht (z.B. Übergangs- und Zentralregionen des SFO).

V.2.2 Lichtmikroskopische Lokalisation von ANG II im SCN

Auf lichtmikroskopischer Ebene gelang hier erstmalig der Nachweis von ANG II-IR im SCN normotensiver SDR. ANG II-IR konnte gehäuft in Perikarya vereinzelter SCN-Neurone gezeigt werden. Des Weiteren wurden Immunreaktionen an den Endothelien zahlreicher SCN-Kapillaren beobachtet und eine massive Akkumulation an größeren Blutgefäßen in unmittelbarer Nähe zum SCN nachgewiesen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stimmen mit den Befunden einer früheren Studie zur ANG II-IR im SCN von normotensiven C57/6J Mäusen insofern überein, als dass dort ebenfalls eine massive ANG II-IR in Perikarya von SCN-Neuronen auf lichtmikroskopischer Ebene beobachtet wurde [1]. Im Gegensatz zur C57/6J Maus, in der ANG II-immunreaktive Neurone hauptsächlich in der Schalen-Region des SCN³⁷ beschrieben, aber nicht dokumentiert wurden, lässt sich für die Lokalisation der ANG II-immunreaktiven Neurone von SDR keine eindeutige Präferenz zwischen Schalen- und Kernregion des SCN ausmachen. Die einzige vergleichbare immunhistologische Studie an SDR, konnte ANG 1-7-IR in Perikarya vereinzelter SCN-Neurone demonstrieren [54]. Die Immunreaktivität des ANG II-Konkurrenten ANG 1-7 wurde hier als auf den medialen Teil des SCN begrenzt beschrieben.

V.2.3 Lichtmikroskopische Lokalisation von AT₁-Rezeptoren im SCN

Im Gegensatz zu der einzigen immunhistologischen Studie, in der die AT₁-IR im SCN von normotensiven SDR zumindest als schwache Färbung erwähnt, aber nicht gezeigt wurde [31],

³⁷ Nach R.Y. Moore [74, 75] ist der SCN in zwei Regionen unterteilt, einen äußeren Schalenbereich und einen inneren Kernbereich. Beide Regionen sollen unterschiedliche physiologische Aufgaben im zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik der Säugetiere innehaben.

konnte in der hier vorgelegten Arbeit die AT₁-IR im SCN von SDR und transgen-hypertensiven TGR auf lichtmikroskopischer Ebene aufgezeigt werden.

Die lichtmikroskopischen Befunde von normotensiven SDR und transgen-hypertensiven TGR Ratten zeigen erstmalig, dass die AT₁-Rezeptoren im SCN in weit geringerem Ausmaß als im PVN und SON vorhanden sind. In diesen beiden Kerngebieten konnte die AT₁-IR in und an Neuronen identifiziert werden, was in weiten Teilen den Ergebnissen einer anderen immunhistologischen Studie zur AT₁-IR im PVN und SON entspricht. AT₁-IR konnte dort sowohl im Zytoplasma, als auch an den Zellmembranen von Neuronen eindeutig nachgewiesen werden [87].

Im Gegensatz zur ANG II-IR lässt sich im Falle der AT₁-Rezeptoren keinerlei lokale Akkumulation an Perikarya der SCN-Neuronen erkennen. Diese zeigen nur schwache bzw. punktuell begrenzte Immunreaktionen in ihren Perikarya und an ihren Zellmembranen. Aufgrund der hier gezeigten feinen Immunmarkierungen im gesamten SCN-Neuropil, erscheint es gerechtfertigt, ein dichtes, über den ganzen SCN verlaufendes Netzwerk an AT₁-Rezeptoren, z.B. an Dendriten, axonalen Terminalen und Gliaelementen zu vermuten. Dies entspricht den Aussagen einer neueren Studie, die ebenfalls nur über eine schwache AT₁-IR im SCN von SDR berichten konnte, diese aber nicht dokumentierte [31].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit AT₁-IR an den Endothelien von SCN-Kapillaren und SCN nahen Blutgefäßen von SDR und TGR nachgewiesen werden.

V.2.4 Die Diskrepanz zwischen immunhistologischen Befunden und Ergebnissen aus autoradiographischen- und Ligand-Bindungs-Studien

Untersuchungen zu AT₁-Rezeptoren im SCN von hypertensiven und normotensiven Ratten wurden bisher semiquantitativ mittels Autoradiographie durchgeführt. So konnte ein Vergleich zwischen DOCA-Salz hypertensiven Ratten und normotensiven Wistar-Kyoto Kontrollen eine vermehrte AT₁-Rezeptordichte im SCN der hypertensiven Tieren nachweisen [35]. Mit derselben Methode konnte zwischen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und normotensiven Wistar-Kyoto Kontrollen jedoch keine höhere Konzentration von AT₁-Rezeptoren im SCN aufgezeigt werden [36].

Auch die Untersuchungen zur AT₁-Rezeptor-mRNA zeigen widersprüchliche Ergebnisse. So wurde die AT₁-mRNA-Konzentration im SCN von Ratten mittels Autoradiographie zum einen als moderat beschrieben [15], zum anderen konnte sie in Ligand-Bindungsstudien gar nicht nachgewiesen werden [59, Hauptfleisch unveröffentlicht].

Bei näherer Betrachtung der hier vorgelegten immunhistologischen Befunde der AT₁-Rezeptoren im SCN von normotensiven SDR und deren Vergleich mit autoradiographischen

Untersuchungen und Ligand-Bindungsstudien wird die Diskrepanz der Ergebnisse besonders deutlich. So zeigt die lichtmikroskopische Immunhistologie im SCN-Gewebe z.B. nur eine schwache AT₁-IR, offenbart dafür aber zusätzlich eine stärkere AT₁-IR in den Endothelien der SCN nahen oder SCN eigenen Blutgefäßen.

V.2.5 Elektronenmikroskopische Lokalisation von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im ‚Zentralen Nervensystem‘

Im Verlauf dieser Arbeit konnte ANG II- und AT₁-IR mittels Immunhistologie auf elektronenmikroskopischer Ebene in diversen Zelltypen in folgenden Arealen des Hypothalamus von normotensiven Ratten subzellulär beschrieben werden.

V.2.5.1 Im Ependym des 3.Ventrikels:

- | | |
|----------------------|---|
| ANG II-IR: | <ul style="list-style-type: none">- in freien Vesikeln im Zytosol- an Teilen des Golgi Apparats- im nuklearen Plasma- an den Zellmembranen |
| AT ₁ -IR: | <ul style="list-style-type: none">- an freien Vesikeln im Zytosol- am <i>endoplasmatischen Retikulum</i>- an den Zellmembranen |

V.2.5.2 In Gliazellen - vermutlich Astrozyten - im Hypothalamus:

- | | |
|----------------------|---|
| AT ₁ -IR: | <ul style="list-style-type: none">- am <i>endoplasmatischen Retikulum</i> |
|----------------------|---|

V.2.5.3 In SCN-Kapillaren:

- | | |
|----------------------|---|
| ANG II-IR: | <ul style="list-style-type: none">- in freien Vesikeln im Zytosol- in endo- und/oder exozytotischen Vesikeln- im nuklearen Plasma- an der äußeren Kernmembran- an den Zellmembranen |
| AT ₁ -IR: | <ul style="list-style-type: none">- in freien Vesikeln im Zytosol- in endo- und/oder exozytotischen Vesikeln- an der äußeren Kernmembran- an den Zellmembranen |

V.5.2.4 In Gliazellen in der perivaskulären Region von SCN-Kapillaren:

- ANG II-IR:
- in freien Vesikeln im Zytosol
 - in endo- und/oder exozytotischen Vesikeln
 - an den Zellmembranen
- AT₁-IR:
- in freien Vesikeln im Zytosol
 - in endo- und/oder exozytotischen Vesikeln
 - an den Zellmembranen

V.5.2.5 In Neuronen des SCN:

- ANG II-IR:
- in freien Vesikeln im Zytosol der Perikarya
 - in freien Vesikeln in axonalen Terminalen
 - in Vesikeln in der präsynaptischen Region
 - in pinozytischen Vesikeln in Dendriten
 - an Teilen des Golgi Apparats
 - im nuklearen Plasma
 - an der äußeren Kernmembran
 - an den Zellmembranen der Perikarya
 - an Zellmembranen von axonalen Terminalen ohne synaptische Spezialisierung
 - an synaptischen Membranen
- AT₁-IR:
- in freien Vesikeln im Zytosol der Perikarya
 - an freien Vesikeln in axonalen Terminalen
 - an Vesikeln in der präsynaptischen Region
 - an der äußeren Kernmembran
 - an den Zellmembranen der Perikarya
 - an Zellmembranen von axonalen Terminalen ohne synaptische Spezialisierung
 - an synaptischen Membranen

V.3 Die Genese des Octapeptids ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im ‚Zentralen Nervensystem‘ von normotensiven Ratten

V.3.1 Die Genese ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im Ependym des 3.Ventrikels

Die kontinuierlich und gehäuft auftretende Präsenz von ANG II-IR in den Zellkernen von epithelialen Zellen des Ependyms des 3.Ventrikels spricht für eine Produktion von ANG II innerhalb des Ependyms. Gestützt wird diese Hypothese durch den Nachweis von vermehrter ANG II-IR am Trans-Golgi-Netz und seiner sekretorischen Vesikel [125]. Starke ANGII-IR an den lateralen Zisternen des Golgi Apparat, weist ebenfalls auf einen umfangreichen Transportprozess innerhalb dieser Zellen hin [125]. ANG II könnte also aus dem Ependym des Ventrikels über Exozytose in den CSF abgegeben werden.

Die Beobachtung von zahlreichen AT₁-immunreaktiven Vesikeln im Zytosol der ependymalen Zellen und die gleichzeitige Lokalisation von ANG II-IR in freien, d.h. im Zytosol befindlichen Vesikeln, deuten an, dass der Transport von ANG II hier rezeptorvermittelt und hauptsächlich vesikelgebunden stattfindet [125]. AT₁-IR in bemerkenswerten Mengen am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) sowie an den Übergangsbereichen des endoplasmatischen Retikulums (tER) weisen auf eine autonome Rezeptorproduktion im Ependym hin [125].

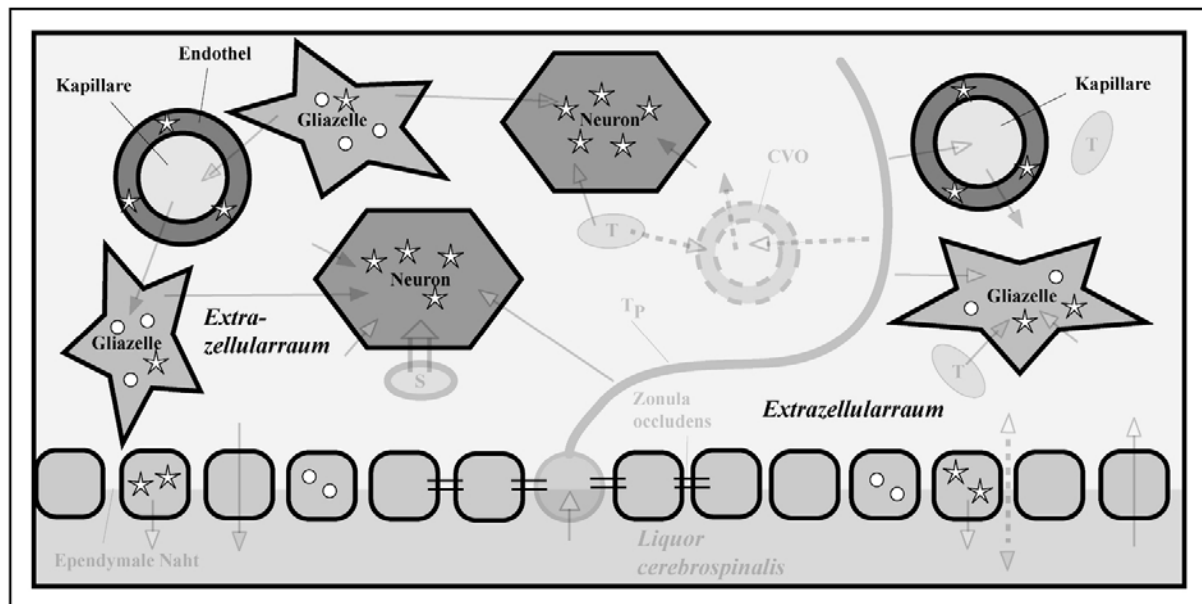


Abb.62: Die Genese von Angiotensin II und seiner AT₁-Rezeptoren

Ausschnitt aus Abb.61 zeigt die Orte der ANG II- und AT₁-Rezeptor-Synthese. ANG II wird im Endothel von Blutgefäßen, im Ependym des 3.Ventrikels, sowie in Neuronen und Gliazellen intrazellulär synthetisiert (weiße Sterne). Darüber hinaus sind zumindest Gliazellen und ependymale Zellen befähigt AT₁-Rezeptoren autonom zu produzieren (weiße Kreise).

V.3.2 Die Genese von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren in hypothalamischen Kapillaren

Die Akkumulation von ANG II im Zytosol und in Zellkernen von kapillaren Endothelzellen spricht neben der Möglichkeit der Speicherung des Octapeptids auch für eine lokale Produktion von ANG II innerhalb des Endothels [125]. Von hier aus kann es dann mittels Exozytose in das Lumen abgegeben oder teilweise durch Angiotensinasen degradiert werden. Dies wurde für andere Blutgefäße im Gehirn bereits hypothesisiert [42].

Ein Nachweis von AT₁-Rezeptoren am rER von Endothelzellen ist bisher nicht verfügbar. Ebenso fehlen Untersuchungen zu Rezeptor-mRNA innerhalb von Endothelzellen. Nichtsdestoweniger erscheint es schlüssig anzunehmen, dass ANG II-produzierende Endothelzellen über die Möglichkeit der autonomen Genese von AT₁-Rezeptoren verfügen. Die Tatsache, dass Endothelzellen als primärer Wirkungsort und potenzieller Umschlagplatz für das im Gefäßsystem zirkulierende Octapeptid - dessen Wirkung hier ausschließlich von AT₁-Rezeptoren vermittelt wird - angesehen werden, macht es wahrscheinlich, dass dieser Rezeptor auch an Ort und Stelle, nämlich im Endothel produziert wird.

V.3.3 Die Genese von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren in Gliazellen in den perivaskulären Regionen des ‚Zentralen Nervensystems‘

Die hier beschriebenen Befunde machen es wahrscheinlich, dass perivaskuläre Angiotensine, wie bereits vermutet, in Astroglia gebildet werden [95]. Zwar gelang bisher kein Nachweis von ANG II-IR innerhalb von Zellkernen der Astrozyten, frühere Studien konnten jedoch demonstrieren, dass der ANG II Vorläufer Angiotensinogen in Astrozyten synthetisiert wird [22, 122].

Die erstmalige Lokalisation von AT₁-IR am rER von Gliazellen - vermutlich Astrozyten - [125], bestätigt den Befund, dass AT₁-Rezeptoren in Gliazellen synthetisiert werden [122] und macht eine autonome Rezeptorproduktion in perivaskulärer Glia sehr wahrscheinlich.

V.3.4 Die Genese von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren in Neuronen des SCN

Aufgrund der massiven ANG II-IR im Kernplasma einzelner Neurone im SCN scheint es schlüssig anzunehmen, dass Neurone ANG II nicht nur als Hormon/Rezeptor-Komplex aufnehmen, sondern es vielmehr selbst produzieren können, wie es zum Beispiel bei fetalen Kardiomyozyten beobachtet wurde [105]. Das gehäufte Auftreten von ANG II innerhalb der Zellkerne weniger Neuronen, sowie der Nachweis von ANG II-IR an Elementen des *Golgi Apparat* dieser Neurone im SCN spricht für die Genese von des Octapeptids innerhalb dieser

Zellen [127]. Beobachtungen [nicht gezeigt] von gehäufte intrazellulärer ANG II-IR in anderen Kerngebieten des Hypothalamus (z.B. dem PVN), der AV3V (z.B. OvLT) und der präoptischen Region (z.B. MnPO), lassen annehmen, dass eine ausgesuchte Anzahl von Neuronen im ZNS die Fähigkeit zur ANG II-Genese besitzt. Diese erfolgt vermutlich, wie bei Gliazellen, über eine direkte, intrazelluläre Synthese aus Angiotensinogen.

Die Abwesenheit von AT₁-IR am rauen endoplasmatischen Retikulum dieser ANG II-produzierenden SCN-Neuronen deutet an, dass AT₁-Rezeptoren in diesen Zellen nicht synthetisiert werden [128]. Untersuchungen zur AT₁-Rezeptor-mRNA im SCN konnten bislang keinen Hinweis auf eine Genese des Rezeptors im zentralen Schrittmacher geben [59, Hauptfleisch unveröffentlicht]. Diese Befunde können aber nicht auf alle anderen Neuronen im ZNS übertragen werden. So spricht die massive intrazelluläre Akkumulation von AT₁-IR in Neuronen des MnPO und des SFO für eine Genese des Rezeptors in diesen Zellen. Darüber hinaus, bekräftigen Beobachtungen [nicht gezeigt] von gehäufte AT₁-IR in unmittelbarer Nähe des rER von Neuronen im Hypothalamus normotensiver SDR die Annahme, dass Neurone zur Synthese von AT₁-Rezeptoren befähigt sind.

V.3.5 Die intrazelluläre Genese von ANG II aus Angiotensinogen in Epithel- und Endothelzellen sowie Gliazellen und Neuronen

Die hier vorgestellte Hypothese, dass Epithel- und Endothelzellen, Gliazellen sowie Neurone ANG II produzieren korrespondiert mit dem jüngsten Arbeitsmodell der intrazellulären ANG II-Produktion (siehe Abb.6, das lokale ZNS-RAS) [Übersicht in 52]. Nach der geltenden Vorstellung wird Angiotensinogen in Gliazellen und Neuronen gebildet und kann in den Extrazellularraum freigesetzt und dort durch Renin in ANG I gespalten werden. Im Anschluss wird ANG I durch ein Konversionsenzym (ACE) in ANG II gespalten und dann von den Zellen wieder aufgenommen. Alternativ kann Angiotensinogen allerdings auch direkt innerhalb der Neurone durch Cathepsin G oder Tonin in ANG II überführt werden [21, 52].

Die intrazelluläre Genese von ANG II in Neuronen und Astrozyten ist Zurzeit noch Gegenstand einer lebhaften Diskussion. Erschwert wird der Nachweis der intrazellulären Synthese von ANG II durch die komplizierte Lokalisation seines intrazellulären Vorläufers Angiotensinogen [Übersicht in 111]. Einige immunhistologische Studien konnten Angiotensinogen in Neuronen und Astrozyten bereits nachweisen [76, 130], wohingegen der Nachweis von Angiotensinogen in neuronalem Gewebe in anderen nicht gelang [22, 40]. Erschwert wird die Suche nach dem Vorläufer von ANG II maßgeblich durch die Tatsache, dass unterschiedliche Gewebeformen unterschiedliche Angiotensinogene produzieren. Zumindest konnten Studien an Kulturen von neuronalem und glialem Gewebe

Angiotensinogene aufzeigen, die sich interessanterweise sowohl von Kreislauf-Angiotensinogen, als auch von einander unterscheiden [111].

V.3.6 Die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen zur Verifizierung der ANG II- und AT₁-Rezeptor-Genese im ‚Zentralen Nervensystem‘

Das sich das Modell der intrazellulären ANG II-Genese auch auf die Epithelzellen des Ependyms und auf Endothelzellen von Gehirnkapillaren übertragen lässt, ist wahrscheinlich, bedarf aber noch weiterführender Studien.

Maßgeblich für die Verifizierung des intrazellulären ANG II-Genesemodells und seine Übertragbarkeit auf andere Zelltypen ist die Erfassung seines Vorläufers Angiotensinogen mittels immunhistologischer Methoden auf ultrastruktureller Ebene, denn nur die genaue Kenntnis über die Lokalisation von Angiotensinogen und seiner mRNA auf subzellulärer Ebene lässt fundierte Rückschlüsse über die Syntheseprozesse innerhalb dieser Zellen zu. Bisher werden solche Untersuchungen allerdings durch fehlende Kenntnisse über die verschiedenen Angiotensinogene in den unterschiedlichen Zelltypen und die damit verbundene Unkenntnis über ihre antikörperrelevanten Charakteristika verzögert.

Die Frage nach der Synthese des AT₁-Rezeptors in Endothelzellen von Gehirnkapillaren sollte mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern hinreichend beantwortet werden können. Die Tatsache, dass innerhalb dieser Studie keine AT₁-immunreaktiven Anteile des rER identifiziert werden konnten ist wahrscheinlich auf die begrenzte Anzahl der untersuchten elektronenmikroskopischen Proben zurückzuführen. Die Analyse der quer geschnittenen Kapillarwände zeigt nur kleine zweidimensionale Ausschnitte der beobachteten Endothelzellen, so dass der Grossteil der Perikarya dem Betrachter verborgen bleibt. Diese Informationslücke kann durch einer konzentrierten Studie mittels einer lückenlosen ultradünnen Schnittserie durch eine Endothelzelle geschlossen werden.

V.4 Die Verteilung der AT₁-Rezeptoren und der rezeptorgebundene Transport von ANG II im ‚Zentralen Nervensystem‘ normotensiver und transgen-hypertensiver Ratten

V.4.1 Die subzelluläre Verteilung der AT₁-Rezeptoren: Aufnahme und intra- und extrazelluläre Transportmechanismen

V.4.1.1 Intrazellulärer Transport von ANG II im Ependym des 3.Ventrikels

Die Immunsignale der ANG II- und AT₁-IR entlang den luminalen Zellmembranen unterstützen die Hypothese, dass ANG II an seinen membranständigen AT₁-Rezeptor bindet, eine Konformationsänderung bewirkt und damit eine sofortige intrazelluläre Reaktionskaskade auslöst [11, 52, 129].

Die Identifikation von ANG II- und AT₁-IR an Vesikeln in unmittelbarer Nähe der Zellgrenzen spricht allerdings auch für eine Agonistinduzierte, Rezeptorvermittelte Endozytose von ANG II [72, 129], wie dies bereits für Enkephaline und andere Neuropeptide vermutet wird [106, 137]. Diese Endozytose repräsentiert möglicherweise einen Eintrittsweg für ANG II in die Zelle. Hier kann das Neuropeptid dann direkt auf AT₁-Rezeptoren im Zytosol wirken [129]. In dem Hormon/Rezeptor-Komplex kann das Neuropeptid aber auch zum Kern verbracht und über AT₁-Rezeptoren an der äußeren Kernmembran ins Kernplasma eingeschleust werden. ANG II bindet dann vermutlich an Chromatin und bisher unbekannte AT-Rezeptoren und wirkt auf der Ebene des Kerns [10]. Besonders Chromatin konnte bei Hepatomzellen der Ratte, bzw. in isolierten Zellkernen als hoch affinitive Bindungsstelle für Insulin [116, 117, 131], respektive für ANG II [37, 97, 99, 100] identifiziert werden.

Die Internalisation des Peptid/Rezeptor-Komplexes kann als Teil eines Desensibilisierungsprozesses interpretiert werden [129]. Außerdem dient die Rezeptorendozytose vermutlich als Translationsprozess des Membranrezeptors zum Kern [64].

Die Demonstration von ANG II-IR in der Region des *Golgi Apparat* und an Transport- und Sekretionsvesikeln des Trans-Golgi-Netzes lässt vermuten, dass ANG II in weitere Rezeptorvermittelte Transportprozesse durch das Zytosol eingebunden ist. Wobei der membranständige AT₁-Rezeptor das in Vesikeln eingeschlossene Neuropeptid an den Ort seiner Speicherung, seines Abbaus oder seiner Freisetzung durch Exozytose geleitet. Ob der Aufnahme in die Zellen durch Endozytose von Neuropeptiden eine direkte Abgabe durch Exozytose auf der entgegengesetzten Seite des Ependyms folgt oder ob es sich um einen transzytotischen Prozess handelt, ist bis heute unklar [137]. Auch die Frage ob es sich um einen einfach- oder bidirektionalen Transport von ANG II handelt kann hier nicht hinreichend geklärt werden.

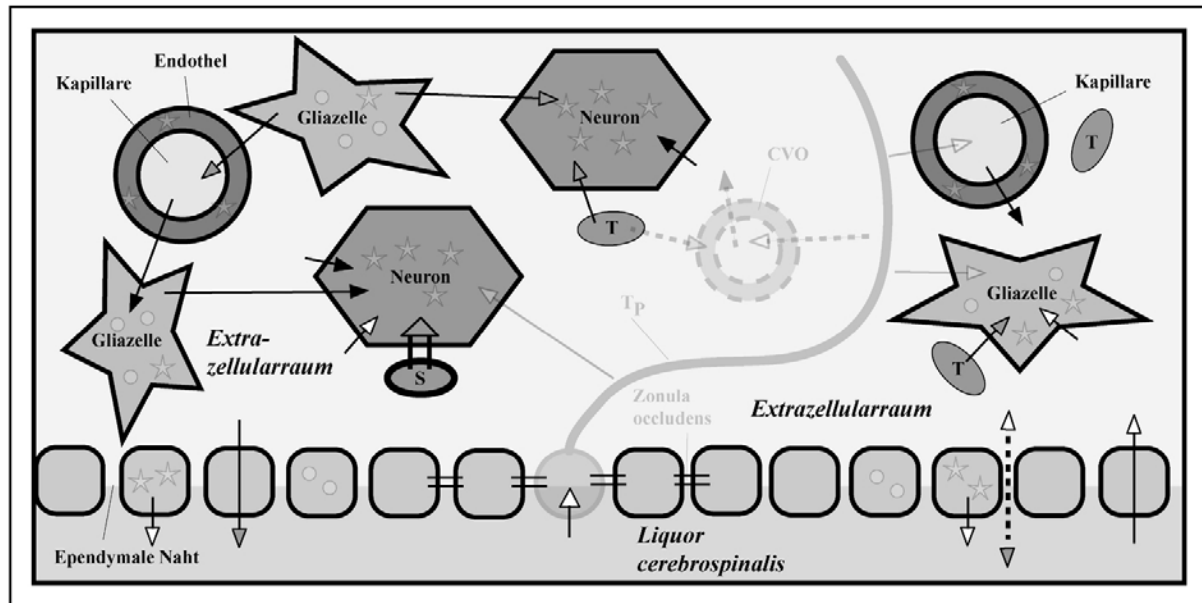


Abb.63: Die Verteilung von Angiotensin II

Ausschnitt aus Abb.61 zeigt mögliche Transportwege von ANG II. Zirkulierendes ANG II (schwarze Pfeile) gelangt über einen aktiven Transportmechanismus (vesikelgebundener Hormon/Rezeptor-Komplex) durch ‚ungefensterte‘ Kapillaren in deren perivaskuläre Regionen. Hier wirkt es entweder auf Neurone oder Gliazellen oder wird von letzteren über den Hormon/Rezeptor-Komplex zum Ort seiner Freisetzung, Speicherung oder Abbau in Neuronen oder in den Liquor verbracht. Gliazellen und Neurone setzen ihrerseits ANG II (graue Pfeile) in den Extrazellulärraum frei oder transportieren das Neuropeptid in einem Hormon/Rezeptor-Komplex zu Orten seiner Wirkung (in Neurone und Gliazellen, dem Liquor oder dem Gefäßlumen). Gehirn-ANG II gelangt entweder über einen passiven Transport (Diffusion) durch die ‚ependymale Naht‘ oder wird aktiv durch das Ependym geschleusst. Außerdem wirkt Gehirn-ANG II als Neurotransmitter an axondendritischen und axonsomatisischen Synapsen (breiter grauer Pfeil). Liquor-ANG II diffundiert über die ‚ependymale Naht‘ der Ventrikelauskleidung in den Extrazellulärraum oder wird aktiv in dem vesikelgebundenen Hormon/Rezeptor-Komplex durch das Ependym und das dahinter liegende Endothel ins Gefäßlumen befördert (weiße Pfeile). Aus dem Extrazellulärraum wird es von Neuronen oder Gliazellen aufgenommen und zum Ort seines Wirkens verbracht. Aktive Prozesse sind als durchgehende, passive Prozesse als gestrichelte Linien dargestellt. Abkürzungen: wie zuvor.

V.4.1.2 Extrazellulärer Transport durch das Ependym des 3.Ventrikels (Diffusion)

Die Darstellung von ANG II- und AT_1 -IR in den Extrazellulärräumen zwischen den ependymalen Zellen spricht für einen passiven Diffusionsprozess durch diese Räume. *Zonulae occludentes*, welche die Diffusion durch den Extrazellulärraum der ‚ependymalen Naht‘ zwischen den Epithelzellen verhindern, fehlen über weite Strecken des Ependyms, sodass ein passiver Diffusionsprozess wahrscheinlich ist [106, 125, 137]. Die häufigen AT_1 - und ANG II-IR entlang des Extrazellulärraums zeigen, dass ANG II extrazellulär - dort wo es möglich ist - durch das Ependym des 3.Ventrikels diffundiert. Die DAB-Reaktionsprodukte an den benachbarten Zellmembranen der Epithelzellen sowie die starken AT_1 - und ANG II-Immunsigale an Reservoir ähnlichen Erweiterungen im basalen Bereich des ‚ependymalen Naht‘ bestärken diese Hypothese [125]. Darüber hinaus weisen sie auf eine funktionelle Rolle des Ependyms als regulatorisches Element der ANG II-Diffusion hin. Ob dieser Diffusionsprozess einseitig oder bidirektional ist, ist momentan noch Gegenstand einer Diskussion [137].

V.4.2 Die Verteilung von ANG II und dessen AT₁-Rezeptoren in Kapillaren und deren perivaskulären Regionen im Hypothalamus deutet auf einen aktiven bidirektionalen Transport durch das Endothel hin

V.4.2.1 Die Aufnahme und der intrazelluläre Transport von ANG II in Kapillaren

Die ANG II- und AT₁-Immunsignale an den luminalen Zellmembranen der Kapillaren deuten an, dass zirkulierendes ANG II auf diese Gefäße über deren AT₁-Rezeptoren wirkt. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits an anderen Gehirnblutgefäßen gemacht werden [4]. Die ultrastrukturellen Ergebnisse zur ANG II- und AT₁-IR in SCN-Kapillaren entsprechen hierbei den Beobachtungen, die in der Testphase dieser Arbeit an Kapillaren im Hypothalamus von normotensiven Wistar Ratten gemacht wurden. Wie jene im SCN verfügen auch die untersuchten Gefäße im Hypothalamus über eine funktionelle Blut/Hirn-Schranke und zeigen sowohl im Endothel wie auch in der perivaskulären Region ähnliche Immunreaktionen gegen den ANG II- bzw. den AT₁-Rezeptorantikörper. So konnte eine ANG II-Rezeptivität, eine ANG II-Endozytose und die Speicherung des Neuropeptids im Endothel der Kapillaren in allen untersuchten Positionen aufgezeigt werden.

Die hier vorgestellte Darstellung von ANG II-IR und AT₁-IR in endo- und exozytotischen Elementen an den Zellmembranen von Kapillaren sprechen dafür, dass ANG II hier nicht nur eine Konformationsänderung in seinem Rezeptor induziert, was in sofort einsetzenden intrazellulären Signalpfaden resultiert [125, 128]. Vielmehr leitet das Neuropeptid auch einen rezeptorvermittelten Endozytoseprozess ein. Die Präsenz von ANG II- und AT₁-immunreaktiven Vesikeln in unmittelbarer Nähe zur luminalen Zellmembran verstärkt diesen Eindruck [125, 127, 128]. In mehreren Studien konnte das Phänomen der rezeptorvermittelten Aufnahme von ANG II in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden [5, 33, 46, 72]. Immunhistologische und biochemische Studien konnten den Prozess der Rezeptorgesteuerten Aufnahme auch für andere Neuropeptide zeigen [70, 84, 137].

Die Aufnahme in die Zelle ist für Neuropeptid und Rezeptor in vielerlei Hinsicht von Bedeutung. Zum einen eröffnet sich für das Peptid ein Pfad in das Endothel, wo es im Zytosol oder an der Kernmembran auf weitere AT₁-Rezeptoren wirken kann (Möglichkeit einer Signaltransduktion im Zytosol) [33, 46]. Zum anderen kann das Peptid zum Ort seiner Speicherung, seiner Freisetzung durch Exozytose oder seiner Degradierung gelangen [137]. Die wiederholte Beobachtung von ANG II-IR in zytoplasmatischen Kompartimenten deutet auf eine Akkumulation des Neuropeptids innerhalb des Endothels hin (z.B. in Endosomen) [125, 127]. Die Akkumulation von ANG II wurde in anderen Zelltypen bereits bestätigt [5, 37]. Rezeptorendozytose und -transport innerhalb der Zelle dienen, wie bei den Epithelzellen des Ependyms, wahrscheinlich als Translationsprozess des Membranrezeptors zum Nukleus

[64]. Außerdem kann die Internalisation des Peptid/Rezeptor-Komplexes hier ebenfalls Teil eines Desensibilisierungsprozesses des Endothels sein [129].

Die Identifikation von ANG II-IR an den Kernmembranen und im Kernplasma spricht ebenfalls für die Hypothese, dass ANG II teilweise zum Nukleus der Endothelzellen transportiert wird [127]. Diese Annahme wird auch durch das Vorhandensein der AT₁-Rezeptoren an den Kernmembranen gestützt [128].

AT₁-Rezeptoren in der äußeren Kernmembran repräsentieren, wie auch im Ependym des 3.Ventrikels einen möglichen Weg über den das Peptid in den Nukleus eingeschleust wird. Das Rezeptorgebundene Peptid wird hierbei vermutlich durch Vesikel zur Kernhülle gebracht und durch Endozytose in das Innere der Kernhülle geschleust. Von hieraus kann ANG II, ähnlich wie in ependymalen Zellen in das Kernplasma gelangen, wo es an Chromatin und andere nukleare Bindungsstellen binden kann [10].

Die Tatsache, dass AT₁-IR nur an der Kernmembran aber nicht innerhalb des Kernplasmas von Endothelzellen dargestellt werden konnte, deutet darauf hin, dass der bekannte AT₁-Rezeptoruntertyp nicht im Nukleus vorhanden ist. Neben Chromatin, welches eine hohe Affinität zu ANG II besitzt [99, 100], müssen also alle anderen nuklearen ANG II Bindungsstellen zumindest in gewissem Umfang³⁸ vom bekannten AT₁-Rezeptoruntertyp verschieden sein [97, 98].

V.4.2.2 Der interzelluläre Transport von zirkulierendem ANG II durch das Kapillarendothel zu periendothelialen Gliazellen

In der Testphase dieser Arbeit gelang die Darstellung von ANG II- und AT₁-IR an periendothelialen Gliaelementen, die eine Wirkung von zirkulierendem ANG II auf benachbarte Gliazellen, bzw. einen ANG II-Transport in ihre Richtung wahrscheinlich machen [125]. Dies konnte bei den Untersuchungen in den perivaskulären Regionen von SCN-Kapillaren bestätigt werden [127, 128].

Die konstante ANG II-IR und AT₁-IR an der abluminalen Zellmembran der Endothelzellen lässt vermuten, dass ANG II auf dieser Seite des Endothels über endo- und exozytotische Mechanismen ein- und ausgeschleust wird. Gestärkt wird diese Hypothese durch die Demonstration von ANG II- und AT₁-IR Vesikeln in unterschiedlichen endo- oder exozytotischen Stadien an oder in den Zellmembranen der Endothelzellen [127, 128]. ANG II ist also wahrscheinlich das Objekt eines aktiven rezeptorvermittelten Transports durch das

³⁸ Kleinste Veränderungen in der C-Terminalregion des Rezeptors - gegen die der Antikörper reaktiv ist - verhindern die Antigen/Antikörper-Reaktion und führen so zum Nichtfassen eines möglichen AT₁-Rezeptoruntertyps.

Endothel in die perivaskuläre Region, wie es auch für Insulin, Transferrin und andere Peptide vermutet wird [70, 106, 116, 137].

Die Befunde zur AT₁-IR in periendothelialen Zellen zeigen, dass ANG II auf diese Zellen - vermutlich Astrozyten -, welche in Kontakt mit der ECM stehen, wirkt [125, 128]. Dies entspricht den Ergebnissen, die in perivaskulären Regionen von Blutgefäßen im Hypothalamus gefunden wurden. Die zahlreichen AT₁-IR an periendothelialen Zellmembranen und im zellgrenznahen Zytoplasma dieser Zellen deuten darauf hin, dass die Effekte von zirkulierendem ANG II durch deren AT₁-Rezeptoren vermittelt werden [4]. Immunreaktive endo- und exozytotischen Vesikel in direkter Opposition zu immunreaktiven Sektionen der endothelialen Zellmembranen sprechen für einen Rezeptorgebundenen ANG II-Transport vom Lumen in Richtung der perivaskulären Glia.

V.4.2.3 Der interzelluläre Transport von Gehirn-ANG II von periendothelialen Gliazellen zum Kapillarendothel

Die Untersuchungen in der perivaskulären Region von Kapillaren lassen den Schluss zu, dass von Gliazellen gebildetes ANG II auf die Gefäße wirkt und seinerseits in das Lumen der Kapillaren transportiert werden kann.

Die Häufung von ANG II-IR an Zellmembranen und im Zytoplasma der periendothelialen Zellen deutet aber auch an, dass Gehirn-ANG II, aus Gliazellen, auf die Gefäße wirkt. Dieser Eindruck wird durch das massive Auftreten der AT₁-Rezeptoren in der abluminalen Zellmembran der Endothelzellen bestärkt. Die Präsenz ANG II- und AT₁-immunreaktiver endo- und exozytotischer Elemente an periendothelialen Zellmembranen macht darüber hinaus einen vesikelgebundenen, rezeptorvermittelten Transfer von ANG II in Richtung des Endothels wahrscheinlich [127, 128]. Hier könnte es dann gespeichert, degradiert oder durch Exozytose in das Lumen entlassen werden [137]. Ob dieser Rezeptorvermittelte Transport von Gehirn-ANG II zwischen Endothel und periendothelialen Gliazellen endo- und exozytotischer oder eher transzytotischer Natur ist, ist momentan noch unklar [137].

Auch die Frage nach der Richtung des Transports oder ob es sich um einen bidirektionalen Vorgang handelt ist letztlich unklar, bleibt ohne eine Differenzierung der endo- oder exozytotischen Vesikel Spekulation. Neben dem Effekt auf das Endothel, ist ein parakriner oder autokriner Effekt von Glia-ANG II auf Gliakomponenten ebenfalls denkbar [136]. Es kann letztendlich aber nicht ausgeschlossen werden, dass die AT₁-Rezeptoren in der Gliaperipherie auch die Effekte von neuronalem ANG II vermitteln [136].

V.4.2.4 Die Aufnahme und der intrazelluläre Transport von ANG II in Neuronen des SCN

Eine rezeptorvermittelte Aufnahme von ANG II mittels Endozytose in neuronale Perikarya des SCN konnte nicht nachgewiesen werden [127, 128]. Die Tatsache, dass sowohl ANG II-IR als auch AT₁-IR vesikelgebunden im Zytosol von Neuronen identifiziert wurden, spricht jedoch für einen vesikelgebundenen, rezeptorvermittelten Transport von ANG II innerhalb neuronaler Perikarya. Die Beobachtung von ANG II- und AT₁-IR an der äußeren Kernhülle von SCN-Neuronen macht es wahrscheinlich, dass der membrangebundene AT₁-Rezeptor nicht nur im ANG II-Transport durch das Zytosol involviert ist, sondern vielmehr auch an einem Translationsprozess des Peptids in den Zellkern beteiligt ist [127, 128]. Mit ihm gelangt das vesikelgebundene Peptid in einem Hormon/Rezeptor-Komplex sicher zum Nukleus oder zu den Orten der Speicherung und Degradierung oder wird durch Exozytose wieder freigesetzt. Der internalisierte Hormon/Rezeptor-Komplex kann in Endosomen der Neuronen gespeichert werden [5] oder eine Bedeutung bei der Aktivierung von Signalwegen im Zytosol haben [33]. Gestützt wird die Theorie des Hormon/Rezeptor-Transports durch die Demonstration von ANG II-IR am Golgi Apparat, der eine wichtige Rolle im vesikelgebundenen Transport innerhalb der Zelle spielt [127].

Die starke ANG II-IR in den Zellkernen der SCN-Neurone übertrifft die zuvor dargestellte Immunreaktion in Ependym- und Endothelzellen um ein Vielfaches [127] und impliziert eine massive Akkumulation sowie einen direkten Effekt von ANG II im Nukleus, wie es zuvor für Nierenzellen angenommen wurde [86]. Die Aufnahme von ANG II in Zellkerne mittels Endozytose konnte bereits in Zellen der glatten Muskulatur, Herz- und Leberzellen nachgewiesen werden [47, 101]. Darüber hinaus konnten zahlreiche Studien eine ANG II-Bindung und Akkumulation in Zellkernen - an nicht identifizierten Bindungsstellen und Chromatin - in verschiedenen Geweben - aber nicht in neuronalem Gewebe - nachweisen [5, 9, 10, 33, 37, 38, 46, 77, 86, 131]. Sowohl die Bindung im Kernplasma, als auch an der Kernhülle ist für einige Peptidhormone und Wachstumsfaktoren bereits beschrieben worden [17].

AT₁-IR konnte, wie bei Epithel- und Endothelzellen, nicht im Kernplasma dargestellt werden, so dass neben Chromatin auch im neuronalen Kernplasma die Existenz einer bislang unbekannten ANG II-Bindungsstelle angenommen werden muss.

V.4.2.5 Axongebundene ANG II-Signaltransduktion im neuronalen Netzwerk des SCN

Die Lokalisation von Peptid- und korrespondierender Rezeptorimmunreaktivität in axonalen und dendritischen Vesikeln spricht für einen rezeptorvermittelten, vesikelgebundenen ANG II-Transport zur neuronalen Peripherie oder umgekehrt [125, 127, 128]. In der neuronalen Peripherie kann ANG II dann über den Extrazellularraum oder, dort wo ein direkter Zellkontakt gegeben ist, direkt auf neuronale oder gliale Komponenten im SCN als Neuromodulator wirken. Diese Hypothese wird durch die Identifizierung ANG II-immunreaktiver pinozytischer Vesikel in Dendriten mit Kontakt zum Extrazellularraum gestützt [127].

Die Beobachtung von ANG II- und AT₁-IR axondendritischen Synapsen im SCN-Neuropil legt des Weiteren nahe, dass ANG II im SCN nicht nur die Rolle eines Neuromodulators einnimmt, sondern hier auch als Neurotransmitter dient [125, 127, 128]. Vergleichbare axondendritischen Synapsen konnten bereits im Hypothalamus [80] und im *Nucleus centralis amygdalae* [85] der Ratte identifiziert werden.

V.4.2.6 Ein neuronaler Transport von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren erscheint im ‚Zentralen Nervensystem‘ auch über größere Distanzen möglich

Innerhalb des SFO und des MnPO normotensiver SDR kann innerhalb neuronaler Perikarya eine massive Akkumulation von AT₁-IR festgestellt werden. Darüber hinaus zeigen die axonalen Fortsätze dieser Zellen teilweise über ihren gesamten Verlauf eine starke, kontinuierliche Immunreaktion. Dies deutet auf einen rezeptorvermittelten intrazellulären Transport von ANG II in einem Hormon/Rezeptor-Komplex über neuronale Bahnen hin, wie er bisher nur für die axonähnlichen Fortsätze der Tanyzyten wahrscheinlich gemacht werden konnte [126]. In den Fasern der Tanyzyten des 3.Ventrikels - ependymalen Zellen neuroglialer Herkunft - ist die AT₁-IR intrazellulär über große Distanzen gut zu verfolgen. Wahrscheinlich wird Liquor-ANG II aus dem Lumen des Ventrikels über sie zu Blutgefäßen und neuronalen Bahnen in der retrochiasmatischen Region des Hypothalamus verbracht [126]. Die Möglichkeit, dass dieses gehäufte intrazelluläre AT₁-Rezeptor-Aufkommen in axonalen und axonähnlichen Fortsätzen nur dem Transport des Rezeptors zu Regionen ohne eigene Rezeptorsynthese, d.h. alleine seiner Verteilung im ZNS, dient, kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Bis zur Demonstration korrespondierender ANG II-IR in diesen Strukturen muss diese Alternative weiterhin Berücksichtigung finden.

V.4.2.7 Ist der SCN abhängig von einer externen AT₁-Rezeptor-Synthese?

Die Hypothese, dass AT₁-Rezeptoren über neuronale Fasern zu Zellen oder ganzen Kerngebieten ohne autonome Rezeptorgenese gebracht werden, lässt sich anhand der Befunde im SCN bekräftigen. Die starke AT₁-IR in dicht gepackten Vesikeln in varikösen Fasern des dorsalen und des ventralen SCN deuten zwar auf einen aktiven, rezeptorvermittelten Transport von ANG II hin und erstere korrespondieren auch mit Berichten zu ANG II-immunreaktiven Fasern im dorsalen SCN auf lichtmikroskopischer Ebene [1]. Sie könnten also einen Weg repräsentieren auf dem ANG II rezeptorgebunden in seine Wirkungsregionen im dorsalen Hypothalamus (z.B. dem PVN) verbracht wird.

Andererseits war die Lokalisation von AT₁-Rezeptor-mRNA im SCN bisher nicht möglich [59, Hauptfleisch unveröffentlicht]. Die stark AT₁-immunreaktiven Fasern im SCN könnten also als ein Hinweis darauf gesehen werden, dass der SCN seine AT₁-Rezeptoren nicht in ausreichendem Maße autonom bildet. Dies macht eine zusätzliche Lieferung der Rezeptoren aus anderen Regionen unumgänglich. So könnten beispielsweise die ventralen Fasern, nahe des *Chiasma opticum* eine Verbindung zur Zwischenschicht des *Corpus geniculatum* darstellen. Dort wurden zwar große Mengen AT₁-mRNA, aber keinerlei AT₁-Rezeptoren nachgewiesen [59].

V.4.2.8 Die Signaltransduktion und der interzelluläre Transport von neuronalem ANG II zu Endothelzellen wird durch Gliakomponenten vermittelt

ANG II- und AT₁-IR an axonalen Terminalen und Dendriten in direkten Kontakt zur ECM von Kapillaren mit einer Blut/Hirn-Schranke konnte bisher nicht sicher identifiziert werden [125, 127, 128]. Dies spricht nicht für eine großflächige direkte Wirkung von neuronalem ANG II auf die Gefäße und umgekehrt, wie sie für andere Neuropeptide angenommen wird [137].

Eine direkte Wirkung von der Gefäßwand auf Neurone und umgekehrt erscheint also eher unwahrscheinlich. Vielmehr deuten die Ergebnisse in der perivaskulären Region von Kapillaren im Hypothalamus darauf hin, dass Gliaelemente eine besondere Rolle im ANG II-Transport und in der Vermittlung von ANG II-Effekten innehaben. Die gehäufte Lokalisation von ANG II- und AT₁-IR in perivaskulärer Glia entspricht früheren Befunden im *Organum subfornicale* und im *Nucleus hypoglossus* und weist auf die besondere Bedeutung der Glia beim ANG II-Transport hin [92, 124]. Auch die Beobachtung von ANG II-IR an dendritischen Membranen in Kontakt mit Gliamembranen stimmt mit neusten Untersuchungen überein [124] und lässt den Schluss zu, dass Effekte von ANG II bzw. sein

rezeptorvermittelter Transport zwischen Endothelien mit Blut/Hirn-Schranke und Neuronen maßgeblich über Gliazellen durchgeführt wird, welche neuronale Strukturen und Blutgefäße umgeben.

Dem Gegenüber konnten Untersuchungen in den perivaskulären Regionen von Kapillaren ohne Blut/Hirn-Schranke zeigen, dass Neuronen Gehirn-ANG II direkt an die Blutgefäße abgeben. So legt eine elektronenmikroskopische Studie an ‚gefensterten‘ Kapillaren des SFO nahe, dass Gehirn-ANG II rezeptorvermittelt und vesikelgebunden von axonalen Terminalen ohne synaptische Spezialisierung in den varikösen Perivaskularraum der Kapillaren freigesetzt werden [80]. Von hieraus erreicht das Gehirn-ANG II dann ungehindert das Lumen und somit den Blutkreislauf.

V.4.3 Die Verteilung der Angiotensin II (AT₁)-Rezeptoren in Gehirnregionen vor und hinter der Blut/Hirn-Schranke von normotensiven SDR und transgen-hypertensiven TGR

Die hier vorgelegten Befunde zur Immunhistologie des AT₁-Rezeptors im *Nucleus suprachiasmaticus*, in zwei Zirkumventrikularorganen sowie dem *Plexus choroideus* demonstrieren wie variabel die auf die AT₁-IR bei SDR bezogenen Abweichungen im Gehirn von TGR zwischen Hirnarealen vor und hinter der Blut/Hirn-Schranke sind.

V.4.3.1 Der SCN - eine Region, die im Schutz der Blut/Hirn-Schranke weitgehend von den Effekten des überexpremierten Mäusereningsens unbeeinflusst bleibt?

Die Stärke (Intensität, Dichte und Verteilung) der Immunreaktionen, d.h. die Anzahl der AT₁-Rezeptoren im Parenchym des SCN von TGR - also einer Region hinter der Blut/Hirn-Schranke - erscheint auf lichtmikroskopischer Ebene nicht geringer als die im SCN von SDR. Die perivaskulären Regionen der SCN-nahen Blutgefäße bei TGR erscheinen jedoch deutlich weniger rezeptiv für Gehirn-ANG II³⁹.

Demgegenüber weisen Beobachtungen von erhöhter Immunreaktivität im *Nucleus septalis lateralis* sowie in einem Kapillarnetz zwischen *Cingulum* und *Corpus callosum* von TGR auf eine in diesen Regionen (hinter der Blut/Hirn-Schranke) erhöhte Sensitivität gegenüber zentralem Gehirn-ANG II⁴⁰ hin.

³⁹ Zirkulierendes ANG II spielt hier aufgrund der Blut/Hirn-Schranke vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Letztendlich muss der tatsächliche Transfer von Zirkulations- und Gehirn-ANG II durch das Endothel mit einer funktionellen Blut/Hirn-Schranke auf ultrastruktureller Ebene geklärt werden.

⁴⁰ Siehe Fußnote 30.

V.4.3.2 Beeinflusst das überexprimierte Mäuserenigen die Verteilung der AT₁-Rezeptoren in Kerngebieten ohne schützende Blut/Hirn-Schranke?

Im Gegensatz zu den untersuchten Regionen hinter der Blut/Hirn-Schranke ist die AT₁-IR im SFO von TGR deutlich verringert. Hierbei muss jedoch sowohl lokal zwischen einzelnen Regionen des SFO, als auch zwischen Zelltypen differenziert werden. So ist die Anzahl der AT₁-Rezeptoren an neuronalen Strukturen im Übergangsbereich des SFO bei TGR deutlich verringert, während die AT₁-IR an Kapillarendothelien und ihren perivaskulären Regionen im Übergangsbereich bei beiden Rattenstämmen nur geringfügige Schwankungen aufweist. Im zentralen und caudalen Teil des SFO von TGR ist die AT₁-IR im Parenchym deutlich begrenzter als die von SDR.

Das zweite untersuchte CVO, das OvLT, weist im Parenchym seiner einzelnen Untereinheiten keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen auf, d.h. bei beiden Rattenstämmen ist die Rezeptorfärbung durchgängig stark. Eine Tendenz zu einer geringeren AT₁-IR bei TGR ist nicht sicher auszumachen, da die semiquantitative Analyse durch individuelle Schwankungen innerhalb der Versuchstiere eines Stammes erschwert wird. Im Gegensatz hierzu, zeigt sich in den perivaskulären Regionen der größeren Blutgefäße des OvLT überraschenderweise eine teils deutliche Verringerung der Immunreaktion bei TGR. In den perivaskulären Regionen der ‚gefensterten‘ Kapillaren ist diese Verringerung weit weniger ausgeprägt [siehe auch Tabelle 5].

Insgesamt ist die Anzahl der AT₁-Rezeptoren in den untersuchten Regionen ohne funktionelle Blut/Hirn-Schranke bei TGR also teils unverändert, überwiegend aber vermindert [siehe auch Tabelle 5]. Dies deutet auf eine geringere Sensitivität dieser Strukturen sowohl gegenüber zirkulierendem ANG II, als auch gegenüber zentralem Gehirn-ANG II hin.

V.4.3.3 Verhindert das semipermeable Kapillarsystem des ChP Auswirkungen von erhöhter ANG II-Konzentration im Blutkreislauf auf die AT₁-Rezeptorverteilung im Hauptproduzenten des *Liquor cerebrospinalis*?

Im *Plexus choroideus*, der ein semipermeables Gefäßsystem aufweist, wirken die ANG II-Bindungsstellen bei TGR im Ependym deutlich reduziert, was für eine verminderte Rezeptivität gegenüber Liquor-ANG II spricht, wobei eine Reduktion der ANG II-Synthese in den ependymalen Zellen ebenfalls denkbar ist. Die leicht verringerte AT₁-IR im Endothel und in den perivaskulären Regionen der Gefäße des ChP deutet an, dass hier die Sensitivität gegenüber zirkulierendem ANG II ebenfalls, wenn auch nur geringfügig reduziert ist [siehe auch Tabelle 1].

V.4.3.4 Die Auswirkungen des überexprimierten Mäuserenins sind auch im ‚Zentralen Nervensystem‘ messbar

Die hier vorgelegten Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass ANG II (AT₁)-Rezeptoren in einigen Kerngebieten hinter der Blut/Hirn-Schranke, darunter auch im *Nucleus suprachiasmaticus* bei TGR auf lichtmikroskopischer Ebene keine messbaren Veränderungen in ihrer Quantität und Lage durch das zusätzliche Mäuserenin erfahren. Andere Kerngebiete oder Areale im Gehirn der TGR, die ebenfalls hinter einer funktionellen Blut/Hirn-Schranke liegen, zeigen jedoch eine deutliche Erhöhung ihrer AT₁-IR gegenüber den normotensiven Kontrolltieren. Diese Veränderungen stehen im Gegensatz zur Verringerung der AT₁-IR in Kerngebieten ohne eine Blut/Hirn-Schranke und weisen eine räumlich ausgedehnte AT₁-Rezeptorpopulation auf.

Die teilweise deutlich reduzierte Zahl der ANG II-Bindungsstellen in Bereichen ohne Blut/Hirn-Schranke macht es wahrscheinlich, dass das durch Mäuserenin übermäßig produzierte zirkulierende ANG II hemmend auf die Synthese von AT₁-Rezeptoren im Gehirn wirkt. Dies gilt allerdings nur für Regionen, in denen Zirkulations-RAS und Gehirn-RAS nicht durch eine funktionelle Blut/Hirn-Schranke getrennt sind, wie z.B. in den CVO und dem ChP.

Die großteils unveränderte Anzahl der AT₁-Rezeptoren in Kerngebieten hinter der Blut/Hirn-Schranke, wie z.B. dem SCN, spricht dafür, dass die AT₁-Rezeptoren dieser Regionen von einem zirkulationsunabhängigen Gehirn-RAS gebildet werden. Dieses wird vermutlich durch einen streng regulierten ANG II-Transport durch das Endothel vom Einfluss des ANG II im Blutkreislauf abgeschirmt.

Andererseits zeigen die Beobachtungen von erhöhter ANG II-Sensitivität in anderen Gehirnregionen mit Blut/Hirn-Schranke einen Einfluss des übermäßig produzierten Mäuserenins. Damit wird deutlich, dass nicht alle Gehirnregionen - trotz der funktionellen Blut/Hirn-Schranke - in gleichem Maß von den direkten oder indirekten Effekten des Mäuserenins der TGR geschützt oder betroffen sein müssen.

Ob die Variabilität der AT₁-Rezeptorpopulationen in Kerngebieten vor und hinter der Blut/Hirn-Schranke bei TGR auf die jeweilige Beschaffenheit des Endothels, speziell des Kapillarendothels zurück zuführen ist, kann nur durch gezielte lokale Studien ermittelt werden. Zumindest wäre eine durch Hypertonie und der daraus resultierenden Drucksteigerung bedingte Veränderung des Endothels und der Blut/Hirn-Schranke denkbar und müsste im Einzelfall auf ultrastruktureller Ebene untersucht werden.

V.5 Funktionelle Aspekte von ANG II in den Zirkumventrikularorganen, dem ChP und dem SCN bei normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten

V.5.1 Die Zirkumventrikularorgane - Regulatoren des Flüssigkeitshaushaltes vor der Blut/Hirn-Schranke mit direkten und indirekten neuronalen Verbindungen zum zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik?

In weiten Teilen des Gehirns können die größeren Moleküle vieler Polypeptidhormone, darunter auch ANG II, das Kapillarendothel nicht mittels passiver Diffusionsprozesse durchqueren. Dies wird von einer funktionellen Blut/Hirn-Schranke verhindert. ANG II muss hier in weit geringeren Mengen durch aktive vesikelgebundene, transzytotische oder endo- und exozytotische Mechanismen durch das Endothel transportiert werden [34]. Sowohl die Regulation, als auch die Produktion von ANG II im Gehirn scheinen großteils von der des ANG II im Blutkreislauf separiert und unabhängig zu sein [28].

In wenigen Kerngebieten des Gehirns ist die Trennung von Zirkulations-ANG II und Gehirn-ANG II durch morphologische Veränderungen im Kapillarendothel aufgehoben. Das Endothel verfügt hier über Poren („Fenster“), welche eine bidirektionale Diffusion von ANG II erlauben. Die sonst üblichen *Zonulae occludentes* zwischen den Endothelzellen fehlen in diesen „gefensterten“ Kapillaren ebenfalls in vielen Fällen.

Zu den Arealen vor Blut/Hirn-Schranke zählen die Zirkumventrikularorgane CVO), wie z.B. das *Organum vasculosum lamina terminalis* (OvLT) und das *Organum subfornicale* (SFO) in der anteroventralen Region des 3.Ventrikels (AV3V) [28, 34]. Andererseits sind beide CVO trotz ihrer unmittelbaren Nähe zum Liquor cerebrospinalis durch eine Liquor/Hirn-Schranke von dessen Inhaltsstoffen abgeschottet [52], d.h. zirkulierendes ANG II kann hier ungehindert auf Neurone des OvLT und des SFO wirken, die wiederum in verschiedene Areale des Hypothalamus projizieren [28]. Im Umkehrschluss kann zentrales Gehirn-ANG II ungehindert in das Lumen abgegeben werden. Damit erhalten die beiden CVO neben ihrer nachgewiesenen Funktion im Trinkverhalten [69, 82], eine besondere Bedeutung als hypothetische Schnittstellen zwischen dem Blutkreislauf-RAS und ihren lokalen Gehirn-RAS sowie den Gehirn-RAS anderer Kerngebiete im Hypothalamus [52, 62, 69, 82].

Der Theorie der separierten und voneinander unabhängigen RAS folgend, könnte auch das zentrale Gehirn-RAS der transgen-hypertensiven TGR(mREN2)27 großteils von den Effekten des in den Nebennieren übermäßig expremierten Mäuserenins unbeeinflusst bleiben. Wenn vorhanden, müssten die Wirkungen des Mäuserenins auf Komponenten des Gehirn-RAS, wie z.B. auf AT₁-Rezeptoren bei TGR demzufolge hauptsächlich in den Regionen ohne Blut/Hirn-Schranke zu lokalisieren sein.

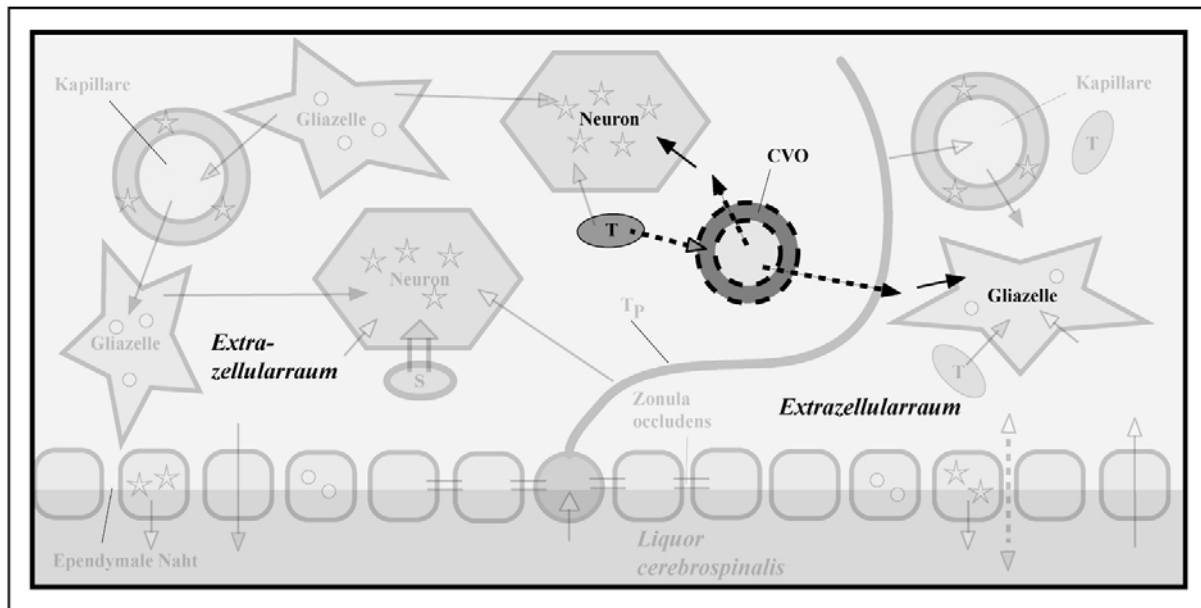


Abb.64: Angiotensin II diffundiert durch das Endothel der ‚gefensterten‘ Kapillaren der Zirkumventrikularorgane. Ausschnitt aus Abb.61 zeigt mögliche Transportwege von ANG II durch Kapillaren ohne funktionelle Blut/Hirn-Schranke. Zirkulierendes ANG II (gestrichelte schwarze Pfeile) gelangt über passive Diffusionsprozesse durch ‚gefensterte‘ Kapillaren (wie Bsp. im OvLT und SFO) in deren perivaskuläre Regionen. Hier wirkt es entweder auf Neurone oder Gliazellen oder wird von letzteren über den Hormon/Rezeptor-Komplex zum Ort seiner Freisetzung, Speicherung oder Abbau verbracht. Gehirn-ANG II (gestrichelte graue Pfeile) gelangt über axonale Terminale in die direkte Umgebung der ‚gefensterten‘ Kapillaren. Hier wird es über sekretorische Vesikel in die perivaskuläre Region ausgeschleust und kann durch die endothelialen ‚Poren‘ ins Lumen diffundieren. Abkürzungen: wie zuvor.

V.5.1.1 Das Gehirn-RAS von transgen-hypertensiven Ratten kompensiert das im Blutkreislauf übermäßig angebotene ANG II in den regulatorischen Zentren des Trinkverhaltens

Zahlreiche Versuchsreihen konnten OvLT und SFO als wichtige regulatorische Zentren des Flüssigkeitshaushaltes ausmachen, wobei die Konzentration von ANG II in der Zirkulation eine entscheidende Rolle im Trinkverhalten und in der Natriumaufnahme der untersuchten normo- und hypertensiven Tiere spielt [Übersicht in 52].

Die hier beschriebenen Befunde wurden aus Gehirnschnitten von SDR und TGR erhoben, die etwa in der Mitte ihrer Ruhezeiten (ZT 6) getötet wurden. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die lokomotorische Aktivität und die Herzfrequenz bei den Vertretern beider Rattenstämme auf ihrem Minimum. Im Gegensatz zum Blutdruck der SDR, der ebenfalls auf einem niedrigen, also der Ruhephase angepasstem Niveau liegt, ist der Blutdruck der transgen-hypertensiven TGR zu diesem Zeitpunkt in seinem oberen Bereich. Der Vorstellung folgend, dass die phasenverschobene Hypertonie der TGR in einer erhöhten ANG II-Konzentration im Blutkreislauf begründet liegt, sollte die Konzentration von ANG II im Blutgefäßsystem des OvLT und SFO bei TGR also ebenfalls erhöht sein. Da sich bei TGR allerdings keine Veränderungen in der lokomotorischen Rhythmik bzw. im Trinkverhalten beobachten lassen,

erscheint es gerechtfertigt anzunehmen, dass die erhöhte ANG II-Konzentration im Blutkreislauf keinen Einfluss auf die Flüssigkeitsaufnahme der transgen-hypertensiven Tiere hat. Ein möglicher Grund hierfür könnte in zwei zusätzlichen regulatorischen Komponenten, dem Gehirn-RAS und dem Liquor-RAS, liegen, welche nachweislich in die Regulation des Trinkverhaltens und der Natriumaufnahme eingreifen [Übersicht in 52]. Demnach könnten beide RAS das übermäßig angebotene ANG II des Blutkreislaufs durch regulatorische Gegenmaßnahmen kompensieren. Die hier beschriebenen Befunde zur AT₁-Rezeptordichte im OvLT und SFO lassen vermuten, dass zumindest das Gehirn-RAS auf die erhöhte ANG II-Konzentration in den Blutgefäßen beider Kerngebiete mit einer Runterregulierung der AT₁-Rezeptoren reagiert.

V.5.1.2 Die erhöhte Konzentration von ANG II im Blutkreislauf reduziert die Sensitivität gegenüber dem Octapeptid in der glatten Muskulatur von Arteriolen-Endästen im OvLT transgen-hypertensiver Ratten

Das OvLT ist von einer Vielzahl gefensterter Kapillaren durchsetzt, d.h. es verfügt über keine der in weiten Teilen des Gehirns sonst üblichen funktionellen Blut/Hirn-Schranken [80, 82]. Demzufolge gelang ANG II aus dem Blutkreislauf ungehindert in die perivaskuläre Region der Kapillaren und umgekehrt. Die AT₁-IR in den Wänden kleinerer Gefäße (8-20 µm im Durchmesser) des OvLT von SDR deutet darauf hin, dass diese für zirkulierendes ANG II sensitiv sind. Die starke Immunreaktivität im Endothel und den perivaskulären Regionen von Arteriolen-Endästen, macht es wahrscheinlich, dass zirkulierendes ANG II aus dem Lumen dieser Gefäße über transzytotische oder endo- und exozytotische Mechanismen aktiv durch das Endothel transportiert wird und auf die glatte Muskulatur, Gliakomponenten und neuronale Strukturen wirkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die AT₁-IR an den Endarteriolen des OvLT von transgen-hypertensiven TGR deutlich schwächer ist als die der SDR. Im Endothel dieser Gefäße ist das Immunsignal zwar nur geringfügig schwächer, zeigt sich in der perivaskulären Region der Arteriolen aber erheblich reduziert. Dies deutet auf geringere Mengen von AT₁-Rezeptoren in der glatten Muskulatur, Gliakomponenten und innervierenden Fasern hin. Da Untersuchungen zur ANG II-IR in dieser Region nicht verfügbar sind, lässt sich über die Ursache der Verringerung der ANG II-Bindungsstellen nur spekulieren. Einerseits ist es denkbar, dass mit morphologischen Veränderungen des Endothels, bedingt durch eine geringere Passierbarkeit für ANG II (druckabhängige Verdickung des Endothels), die Verfügbarkeit von ANG II in der perivaskulären Region abnimmt. Andererseits ist es möglich, dass das zentrale Gehirn-RAS des OvLT auf das

vermehrte Blutkreislauf-ANG II mit einer verstärkten Degradierung des Octapeptids bzw. mit einer Senkung der eigenen AT₁-Rezeptoren reagiert.

Der Theorie nach verhindert die Blut/Hirn-Schranke der größeren Gefäße zwar einen übermäßigen Transport von ANG II aus dem Lumen in die Peripherie, viele der benachbarten ‚gefensterten‘ Kapillaren ermöglichen aber eine ungehinderte Passage des Octapeptids in das Parenchym und könnten so quasi durch die ‚Hintertür‘ auf die perivaskulären Regionen der größeren Gefäße wirken. Elektronenmikroskopische Vergleiche zwischen SDR und TGR müssen hier über etwaige pathologische Veränderung des Gewebes, besonders des Endothels Klarheit bringen.

V.5.1.3 Reduzierte Sensitivität gegenüber ANG II im muskulären Gewebe von Arteriolen-Endästen bei TGR - ein Widerspruch zur vasokonstriktionsbedingten Hypertonie?

Die beobachtete Verminderung der AT₁-Rezeptoren in Bereich der glatten Muskulatur der Endarteriolen, steht auf den ersten Blick im Widerspruch zur vasokonstriktiven Funktion von ANG II. Das Octapeptid wirkt normalerweise als Vasokonstriktor auf das muskuläre Gewebe der Arteriolen. Dieser Effekt wird durch AT₁-Rezeptoren in dieser Region vermittelt, welche bei TGR hier allerdings nur in reduzierter Anzahl vorzufinden sind. Dies spricht nicht für eine verstärkte Vasokonstriktion. Andererseits bedingt die Abwesenheit der AT₁-Rezeptoren ebenfalls eine fehlende Einflussnahme von ANG II auf hier lokalisierte innervierende sympathische und NO-synthetisierende Nervenfasern, die eine wichtige Rolle in der Vasodilatation innehaben [20].

V.5.1.4 Nicht-muskuläre Gefäße scheinen unbeeinflusst von erhöhten ANG II-Konzentrationen im Blutkreislauf

Im Vergleich zu den muskulären Endästen der Arteriolen weisen die nicht-muskulären Abschnitte von kleinen, präkapillären Arteriolen oder/und Kapillaren beider Rattenstämme ein eher einheitliches Bild auf. Die Immunreaktionen in ihren Endothelien, besonders aber das starke Immunsignal in ihren perivaskulären Regionen, kann für eine Wirkung von zirkulierendem ANG II auf die Gefäße bzw. seinen Transport und seine Akkumulation in der perivaskulären Region sprechen. Hier kann zirkulierendes ANG II dann auf AT₁-Rezeptoren der kleinen Gliazellen - vermutlich Astrozyten - wirken, die diese selbst produzieren können [95, 122]. Wahrscheinlich ist die deutliche AT₁-IR aber auch auf das Vorkommen von Gehirn-ANG II in dieser Region zurück zuführen. Sein Transport in das Gefäßlumen erscheint plausibel. Eine frühere ultrastrukturelle Untersuchung in den perivaskulären Regionen von

Kapillaren im OvLT und SFO normotensiver SDR konnte die Existenz von ANG II in Terminalen ohne synaptische Spezialisierung zeigen. Hier soll Gehirn-ANG II über sekretorische Vesikel in den varikösen Perivaskularraum der Kapillaren freigesetzt werden und durch das ‚gefensterten‘ Endothel in das Lumen diffundieren [80]. Ebenso kann eine parakrine und/oder autokrine Wirkung auf Gliakomponenten und Neuronen nicht ausgeschlossen werden [136].

Die ausgeprägte AT₁-IR im Gewebe des OvLT beider Rattenstämme deutet auf eine allgemein hohe Konzentration von ANG II in Gliazellen und Neuronen hin. Sowohl eine erhöhte Aufnahme von zirkulierendem ANG II - durch ‚offene‘ Kapillaren -, als auch die Akkumulation von zentralem Gehirn-ANG II und dessen Abgabe ins Lumen ist denkbar. Erste Betrachtungen vermitteln den Eindruck, dass die Dichte und Intensität der AT₁-IR im Gewebe des OvLT bei TGR und bei SDR mit Ausnahme der perivaskulären Regionen einiger Arteriolen, identisch sind. Individuelle Schwankungen innerhalb der Versuchstiere eines Stammes sind auffällig und erschweren zusammen mit etwaigen Ungenauigkeiten in Schnittdicke die semiquantitative Analyse der Rezeptorfärbung.

Die Vergrößerung, bzw. die Verbreiterung der zentralen Gefäßregion bei TGR, lässt auf grundlegende, Hypertoniebedingte, anatomische Veränderungen bei TGR schließen und bedarf einer näheren Untersuchung an einer größeren Anzahl an Versuchstieren.

V.5.1.5 ANG II-sensitive Tanyzyten im OvLT überwachen die ANG II-Konzentration im 3.Ventrikel

Die Identifizierung stark immunreaktiver Zellen im Ependym des 3.Ventrikels, in Bereichen der zentralen und lateralen Regionen des OvLT, spricht für die Existenz von ependymalen Tanyzyten in dieser Region. Das immunreaktive Fasergeflecht, welches von den Perikarya dieser Zellen bis ca. 100 µm in das benachbarte Gewebe reicht, unterstützt diese Annahme und korrespondiert mit früheren immunhistologischen Befunden dieser Region [91]. Mit Hilfe dieser an der anteroventralen Spitze des 3.Ventrikels gelegenen Tanyzyten könnten Informationen über die ANG II-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* in die periventrikuläre Peripherie zu Blutgefäßen oder Neuronen weitergeleitet werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da das OvLT selbst und die es umgebende Hirnregion gegenüber dem *Liquor cerebrospinalis* durch das Ependym abgeschottet ist. *Zonulae occludentes* verhindern an dieser Stelle eine Diffusion von ANG II durch die ependymale Naht der Ventrikelauskleidung, so dass das Octapeptid nur mittels aktiven Transportprozessen durch das Ependym in den Periventrikularraum gelangen kann [52]. Die Tanyzyten des OvLT

könnten somit eine schnelle Transport- bzw. Informationsleitung für Liquor-ANG II darstellen.

V.5.1.6 Morphologisch verschiedene Regionen des SFO reagieren in unterschiedlichem Maße auf die erhöhte ANG II-Konzentration im Blutkreislauf

Ähnlich dem OvLT ist das SFO morphologisch in verschiedene Regionen unterteilbar. Diese sind durch die Dichte und die Größe der Gefäße voneinander abzugrenzen. Im Gegensatz zum OvLT sind die einzelnen Bereiche des SFO, insbesondere aber die Eigenschaften des Kapillarsystems in ihnen, bereits bestimmt worden [34]. Die ventromedialen Areale der übergangs-, der zentralen sowie der caudalen Region des SFO sind von Gefäßen durchsetzt und gelten als besonders sensitiv für ANG II, wohingegen die rostrale Region sowie die dorsalen Areale der übergangs-, der zentralen und der caudalen Region vermehrt Neuronenpopulationen aufweisen und als weniger sensitiv für ANG II gelten [34].

Etwaige Veränderungen in der Sensitivität, verursacht durch das übermäßig produzierte Blutkreislauf-ANG II bei TGR, sind für die einzelnen Regionen noch nicht beschrieben.

V.5.1.6.1 Die erhöhte ANG II-Konzentration im Blutkreislauf wird von Neuronen im SFO mit einer drastischen Senkung der AT₁-Rezeptoren beantwortet

Das Endothel der Kapillaren der Übergangsregion des SFO ist nicht mit Poren ausgestattet, erlaubt also keine Diffusion von Plasma-ANG II in die Peripherie und umgekehrt (funktionelle Blut/Hirn-Schranke). ANG II muss hier also über aktive Rezeptorvermittelte Mechanismen durch das Endothel transportiert werden, was die zwar sichtbare, aber nicht kontinuierliche AT₁-IR im Endothel erklären könnte [34].

Im Kapillarendothel der Übergangsregion des SFO ist die Dichte und die Verteilung der AT₁-Rezeptoren bei den transgen-hypertensiven TGR gleich der der normotensiven SDR, während die verringerte AT₁-IR in den perivaskulären Regionen dieser Kapillaren bei TGR für eine verminderte Sensitivität gegenüber ANG II spricht. Die zahlreichen kleinen, punktuell sehr begrenzten aber weit verbreiteten AT₁-IR im vorderen Bereich des SFO, deuten auf Markierungen an, bzw. in Dendriten und Terminalen hin. Eine elektronenmikroskopische Studie im SFO konnte ANG II-IR an axonsomatischen und axondendritischen Terminalen, sowie in Extrazellularräumen zeigen und bekräftigt diese Hypothese [92]. Da die betreffenden perivaskulären Regionen eigentlich hinter der Blut/Hirn-Schranke liegen, ist die Verminderung der ANG II-Bindungsstellen dort vermutlich auf eine Runterregulierung der Rezeptoren durch das Gehirn-RAS, bedingt durch das generell vermehrte Aufkommen von Zirkulations-ANG II im SFO, zu vermuten.

Die Tatsache, dass in neuronalen Perikarya des Übergangs-SFO von TGR nur wenige und in deren axonalen Fortsätzen gar keine intrazellulären AT₁-Rezeptoren gefunden wurden, deutet auf massive Veränderungen im zentralen Gehirn-RAS im SFO dieser Tiere hin. Es ist anzunehmen, dass das Gehirn-RAS auf die erhöhte ANG II-Konzentration in der Zirkulation mit einer Verringerung seiner eigenen ANG II-Synthese sowie einer gedrosselten Verteilung von Gehirn-ANG II antwortet. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass das Gehirn-RAS mit einer Verminderung der Bereitstellung des AT₁-Rezeptors in den perivaskulären Regionen hinter der Blut/Hirn-Schranke auf das vermehrte Zirkulations-ANG II reagiert. Heute gilt es als gesichert, dass die Konzentration von Angiotensinogen die Synthese des AT₁-Rezeptors beeinflusst. Deswegen erscheint es schlüssig zu vermuten, dass sowohl gehirneigenes ANG II, als auch dessen Rezeptoren parallel zueinander reduziert werden. Bislang ist das Verhältnis der einzelnen Komponenten des RAS allerdings noch nicht hinreichend geklärt. Die Entwicklung neuer genmanipulierter Rattenstämme ermöglicht erst seit kurzen die Erforschung der konzeptionellen Zusammenhänge. So konnten bislang nur transgene TGR(ASrAOGEN) auf eine Veränderung ihrer AT₁-Rezeptoren im SFO gegenüber SDR verglichen. Bei diesem transgenen Rattenstamm ist die Synthese von Gehirn-Angiotensinogen, dem Vorläufer von Gehirn-ANG II vermindert. Mittels Autoradiographie konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der AT₁-Rezeptoren im SFO der TGR(ASrAOGEN) gegenüber ihren Kontrolltieren verringert war, wobei die Anzahl der AT₁-Rezeptoren in allen Regionen hinter der Blut/Hirn-Schranke größer war als bei den SDR [71]. Eine Differenzierung der AT₁-Rezeptorenanzahl innerhalb der topographischen Organisation des SFO war mittels Autoradiographie jedoch nicht möglich. Die Untersuchung zeigt aber, dass die Interaktion von Zirkulations-RAS und Gehirn-RAS in Regionen vor der Blut/Hirn-Schranke von denen in Regionen hinter der Blut/Hirn-Schranke abweicht.

V.5.1.6.2 In der neuronalen und glialen Peripherie sind die Auswirkungen der erhöhten ANG II-Konzentration im Blutkreislauf nicht so deutlich erkennbar, wie am Ort der AT₁-Rezeptor-Synthese

Im zentralen und caudalen Bereich des SFO kommen Kapillaren mit und ohne funktionelle Blut/Hirn-Schranke vor, d.h. ANG II gelangt sowohl mit aktiven Transportmechanismen, als auch mit passiver Diffusion durch das Endothel in die Peripherie und umgekehrt [34]. Die massive AT₁-IR der perivaskulären Region um den zentralen Gefäßkanal und der ihn umgebenden Kapillaren weist auf eine hohe Sensitivität gegenüber ANG II aus dem Blutkreislauf hin, welches mittels Diffusion durch das ‚offene‘ Kapillarendothel in die Peripherie gelangt. Eine Wirkung von zentralem Gehirn-ANG II kann allerdings auch nicht

ausgeschlossen werden und ein bidirektionaler - ANG II-Transport zwischen Lumen und perivaskulärer Region ist denkbar. So konnte eine immunhistologische Studie im SFO auf ultrastruktureller Ebene zeigen, dass ANG II von axonalen Terminalen über sekretorische Vesikel an gefensterte Kapillaren abgegeben wird [80].

Im zentralen und caudalen Teil des SFO von TGR konnte eine deutliche Markierung der perivaskulären Regionen um den zentralen Gefäßkanal aufgezeigt werden. Die Dichte und besonders die Verteilung der AT₁-Rezeptoren um die Kapillaren bei TGR sind hier jedoch geringer als bei SDR, d.h. die Sensitivität von peripheren glialen und neuronalen Strukturen gegenüber zirkulierenden ANG II erscheint in diesen Regionen verringert. Dies ist vermutlich auf die erhöhte Konzentration ANG II in der Zirkulation, welches das Parenchym mangels einer funktionellen Blut/Hirn-Schranke ungehindert erreichen kann, zurück zuführen und deutet auf eine Runterregulierung der AT₁-Rezeptor-Synthese von Seiten des Gehirn-RAS hin. Die Verringerung der AT₁-Rezeptordichte in diesen Regionen vor der Blut/Hirn-Schranke ist mit denen in den perivaskulären Regionen des Übergangs-SFO, die hinter der Blut/Hirn-Schranke liegen, vergleichbar, d.h. die maßgeblichen Veränderungen sind nicht in der neuronalen oder glialen Peripherie sichtbar. Vielmehr zeigen sich die Unterschiede zwischen SDR und TGR an den Orten der AT₁-Rezeptor-Synthese, also den Perikarya von Neuronen und Gliazellen am deutlichsten.

V.5.1.6.3 Die topographische Organisation des untersuchten Areals muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden

Bisherige Studien im SFO von normo- und hypertensiven Ratten zeichnen ein unklares Bild der AT₁-Rezeptordichte. Autoradiographische Vergleichsstudien zwischen hypertensiven Ratten⁴¹ und normotensiven Kontrollen konnten eine verminderte AT₁-Rezeptorendichte im gesamten Thalamus/Hypothalamus-Gebiet der hypertensiven Tiere zeigen [68, 73, 80, 102, 115]. Die Befunde dieser Studien korrelieren also mit den hier beschriebenen Ergebnissen zur AT₁-Rezeptordichte im SFO von SDR und TGR. Lokal begrenzte Untersuchungen, die nur das OvLT und das SFO einschlossen, wiesen mittels Radioliganden und Autoradiographie an spontan-hypertensiven Ratten (SHR) jedoch eine vergrößerte Dichte der Rezeptorpopulationen in diesen Regionen nach [103, 121]. Darüber hinaus erschien die AT₁-Rezeptordichte in neuronalen Zellkulturen hypertensiver Tiere ebenfalls höher als in den normotensiven Kontrollen [96]. Selbst mit der Berücksichtigung Methodenbedingter

⁴¹ New Zealand strain and spontaneous hypertensive rats

Unterschiede, ist die Diskrepanz der bislang verfügbaren Studien zu groß um eine verlässliche Interpretation der Ergebnisse zuzulassen.

Die bisherigen Untersuchungen machen also deutlich wie wichtig die Eingrenzung des Zielgebietes für die Interpretation der Ergebnisse ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde zur AT₁-Rezeptordichte im SFO von SDR und TGR zeigen darüber hinaus, dass die Kenntnis über die topographische Organisation der Zielareale verbunden mit einer exakten Erfassung der morphologischen Parameter unentbehrlich ist für eine solche Interpretation.

V.5.1.7 Der MnPO - eine Schaltstelle zwischen den Zirkumventrikularorganen und dem zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik

Der *Nucleus medianus* der präoptischen Region ist, obwohl er von zahlreichen Blutgefäßen flankiert wird, laut Literaturbefunden nicht für zirkulierendes ANG II sensitiv, d.h. er besitzt eine funktionelle Blut/Hirn-Schranke, die ihn vom Blutkreislauf abschottet [52]. Früherer Studien zufolge ist der MnPO vielmehr sensitiv für liquorstämmiges⁴² ANG II, welches er durch das Ependym des 3.Ventrikels bezieht, sowie für zentral gebildetes interstitielles⁴³ ANG II, welches ihn über den Extrazellularraum erreicht [80, 88]. Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass wenige Neurone im MnPO von SDR für ANG II aus dem *Liquor cerebrospinalis* oder dem Extrazellularraum sensitiv sind. Die starke intrazelluläre Immunreaktion dieser vereinzelt Perikarya sowie deren Axone sprechen aber darüber hinaus für eine gezielte Produktion von AT₁-Rezeptoren. Des Weiteren deuten die Befunde einen AT₁-vermittelten Weitertransport von ANG II entlang der Mittellinie an und stärken die Theorie von reziproken ANG II-haltigen Fasern zwischen OvLT und SFO. Die Frage ob ANG II tatsächlich mit seinem AT₁-Rezeptor entlang der Mittellinie transportiert wird oder ob nur die Rezeptoren von ihrem Entstehungsort bis zu ihrem Wirkungsort verbracht werden, lässt sich hier nicht beantworten.

Eine Faserverbindung zwischen dem MnPO und vasopressin-haltigen Neuronen im SCN von Schafen konnte bereits früher nachgewiesen werden [81]. Ob diese Fasern ANG II enthalten und somit direkt über AT₁-Rezeptoren auf die Vasopressinexpression und -freisetzung in diesen Neuronen wirken, ist bislang unklar. Die hier vorgelegten Befunde konnten keine AT₁-Rezeptor-haltigen Faser, die einen rezeptorvermittelten Transport von ANG II wahrscheinlich machen würden, identifizieren.

⁴² Das Ependym des 3.Ventrikels ist nahe des MnPO nicht mit *Zonulae occludentes* (Liquor/Hirn-Schranke) versehen, so dass ANG II durch den Extrazellulärraum der ‚ependymalen Naht‘ hindurch diffundieren kann.

⁴³ Von Neuronen und Glia gebildetes ANG II wird in den extrazellulären Raum abgegeben und erreicht über diesen den MnPO.

V.5.1.8 Übermitteln die Zirkumventrikularorgane und der MnPO ANG II-Informationen aus dem Blutkreislauf und dem *Liquor cerebrospinalis* über ihre neuronalen Fasern an Kerngebiete hinter der Blut/Hirn-Schranke?

Durch ihre Sensitivität für ANG II aus dem Blutkreislauf und Liquor-ANG II und ihre mögliche neuronale Anbindung an den SCN gewinnen diese drei Kerngebiete an Bedeutung. Sie bilden eine Schnittstelle zwischen zirkulierendem, zentralem und liquorstämmigem ANG II und könnten über ANG II-haltige Fasern Informationen an andere Kerngebiete im Hypothalamus weiterleiten und/oder empfangen. OvLT, SFO und MnPO sind nach den Berichten verschiedener Studien über ANG II-haltige, reziproke Fasertrakte miteinander verbunden [61, 69]. Eine solche Verbindung, lässt sich anhand der AT₁-IR-Befunde allerdings weder bei SDR noch bei TGR schlüssig nachweisen. Die vorgelegten Ergebnisse machen es aber wahrscheinlich, dass der lang gezogene MnPO über seine Kette von AT₁-IR-Neuronen, eine solche Kommunikationsroute darstellt.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand sind OvLT, MnPO und SFO sowohl mit dem SCN [62, 81], als auch mit dem PVN [7, 69, 83, 123] und dem SON [45, 69, 81] verbunden. Somit könnten diese Areale über OvLT, SFO und MnPO auf drei verschiedene RAS Einfluss nehmen. ANG II-haltige Fasern konnten aber zumindest anhand der AT₁-IR im Hypothalamus nicht nachgewiesen werden.

V.5.2 Plexus choroideus und *Liquor cerebrospinalis*: Quelle und Reservoir einer Zirkulationsunabhängigen Osmoregulation durch ANG II?

Zahlreiche intraventrikuläre ANG II-Infusionsversuche konnten den *Liquor cerebrospinalis* als ein von der Zirkulation unabhängiges Reservoir der Osmoregulation ausmachen und postulieren Liquor-ANG II als einen autonomen zentralen Mediator der Osmoregulation [Übersicht in 52].

Die hier beschriebenen Befunde zur AT₁-Rezeptordichte konnten jedoch zeigen, dass der ChP, der die Quelle des *Liquor cerebrospinalis* ist, in mindestens einer Komponente des RAS bei TGR deutliche Abweichungen zu SDR aufweist. Anhand der in der circadianen Ruhephase der TGR gewonnenen Präparate, konnte nachgewiesen werden, dass zumindest die AT₁-Rezeptordichte im Ependym des ChP gegenüber den normotensiven Kontrollen deutlich reduziert ist. Dies kann als eine regulatorische Gegenmaßnahme durch die Verringerung der Liquor-ANG II Sensitivität interpretiert werden, die letztendlich in einer Reduktion der Liquor-ANG II-Synthese im ChP resultieren könnte.

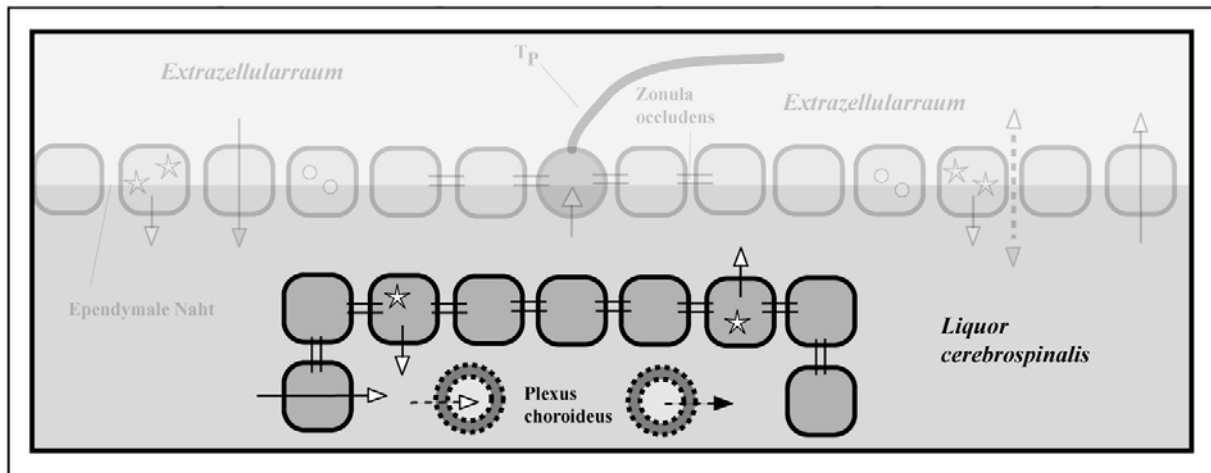


Abb.65: Angiotensin II im *Plexus choroideus*

Ausschnitt aus Abb.61 zeigt mögliche Transportwege von ANG II im ChP. Liquor ANG II wird teilweise im Ependym des ChP synthetisiert (weiße Sterne). Aus dem Ependym wird es entweder in den Liquor entlassen oder gelangt in die perivaskulären Regionen der ChP-Kapillaren (weiße Pfeile). Von hier aus kann Liquor-ANG II dann über das semipermeable Kapillarendothel ins Lumen diffundieren (gestrichelter weißer Pfeil). ANG II aus dem Blutkreislauf gelang über das semipermeable Endothel in die perivaskulären Regionen der ChP-Kapillaren (gestrichelter schwarzer Pfeil). Von wo aus es auf die direkt benachbarten ependymalen Zellen wirken kann. Abkürzungen: wie zuvor.

V.5.2.1 Der ChP und das Ependym der Hirnventrikel produzieren ANG II

Aufgrund seiner Morphologie und seiner exponierten Lage im Ventrikelsystem wurde der ChP lange Zeit zu den Zirkumventrikularorganen gezählt. Heute ist man hiervon weitgehend abgekommen [28] und misst ihm seine besondere Bedeutung bei der alleinigen Produktion des *Liquor cerebrospinalis* zu [48]. Seine exponierte Lage, sowie seine große zottenreiche Oberfläche machen eine Rezeptivität gegenüber Liquor-ANG II sehr wahrscheinlich. Studien im *Liquor cerebrospinalis* von Menschen, Schafen, Hunden und Ratten konnten einzelne Komponenten des RAS, wie Angiotensinogen, ACE, ANG I und ANG II nachweisen [14, 108, 109]. Der Nachweis von Renin gelang im *Liquor cerebrospinalis* allerdings nicht, was zur Annahme führte, dass ANG II nicht dort, sondern im Gehirn und im ChP gebildet wird generiert wird [109]. Die hier beschriebenen Befunde machen es darüber hinaus wahrscheinlich, dass das Ependym der Hirnventrikel nicht nur den Transport von Liquor- und Gehirn-ANG II reguliert, sondern auch an der Produktion von Liquor-ANG II beteiligt ist.

V.5.2.2 Der ChP als Schnittstelle dreier Renin-Angiotensin-Systeme

Der ChP ist von zahlreichen Gefäßen - unterschiedlicher Größe und Eigenschaften - durchzogen und die Morphologie seines Kapillarendothels deutet auf eine Rezeptivität von Zirkulations-ANG II hin, d.h. das Endothel ist ‚gefenstert‘ und ermöglicht somit eine Diffusion von ANG II in die Gefäßperipherie und umgekehrt. Gleichzeitig verfügen die

Endothelzellen der Kapillaren aber über *Zonulae occludentes*, die eine Passage von größeren Peptidmolekülen durch den endothelialen Extrazellulärraum verhindern und so das mögliche Transportvolumen aus und in das Lumen verringern [28]. Wenn das Ependym des ChP über die gleichen funktionellen Eigenschaften verfügt wie die Auskleidung der Ventrikel könnte Liquor-ANG II über das Ependym und das teilweise direkt anschließende Endothel der Kapillaren in die Zirkulation gelangen. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass von Gliazellen produziertes ANG II ebenfalls durch das teils offene Gefäßsystem in den Blutstrom gelangt. Der ChP stellt also eine hypothetische Schnittstelle von Liquor-RAS, gliaproduziertem Gehirn-RAS und Blutkreislauf-RAS dar, wobei nur eine eingeschränkte Blut/Hirn-Schranke die verschiedenen Renin-Angiotensin-Systeme voneinander trennt. Dies macht den ChP zu einem weiteren interessanten Referenzobjekt um die Effekte des Mäuserenins im Blutkreislauf auf Komponenten des Gehirn-RAS, z.B. AT₁-Rezeptoren bei TGR zu ermitteln.

V.5.2.2.1 ANG II aus dem Blutkreislauf wirkt auf Komponenten des ‚Sympathischen Nervensystems‘, auf die NO-Synthese in der glatten Gefäßmuskulatur und reguliert den Blutfluss durch den ChP

Die hier vorgestellten Ergebnisse zur AT₁-IR in den Endothelien seiner Blutgefäße deuten daraufhin, dass der ChP von SDR und TGR gleichermaßen für zirkulierendes ANG II sensitiv ist. Das vielschichtige Immunsignal, in der direkten Umgebung seiner Gefäße macht es darüber hinaus wahrscheinlich, dass die Effekte von Zirkulations-ANG II in beiden Rattenstämmen von AT₁-Rezeptoren in axonalen Terminalen, Dendriten und Gliafortsätzen in der perivaskulären Regionen vermittelt werden. Frühere Studien konnten zeigen, dass sowohl die Blutgefäße, als auch die Epithelzellen des ChP von Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems innerviert werden [24]. Darüber hinaus, verfügen die ChP-Blutgefäße über eine Innervierung durch NO-haltige Fasern [60]. Die häufigen, punktuell begrenzten AT₁-IR in den perivaskulären Regionen der ChP-Kapillaren stützt die Vermutung, dass Zirkulations-ANG II über die AT₁-Rezeptoren auf Elemente des sympathischen Nervensystems und des NO-Systems wirkt und durch Interaktion mit diesen den Blutfluss durch den ChP reguliert [19]. Darüber hinaus weist die AT₁-IR in den Gefäßwänden von SDR und TGR auf die Möglichkeit hin, dass ANG II in aus dem Lumen in den ChP transportiert wird. Hier könnte es gespeichert, abgebaut oder durch das Ependym in den Ventrikel freigesetzt werden. Begünstigt wird dieser hypothetische Transport durch eine in weiten Teilen des Blutgefäßsystems des ChP fehlende Blut/Hirn-Schranke. Zirkulations-ANG II kann also

weitgehend ungehindert durch das ‚gefensterte‘ Endothel in die perivaskuläre Region gelangen [19].

V.5.2.2.2 ANG II im *Liquor cerebrospinalis* reguliert im Ependym des ChP seine eigene Synthese

Die kräftige, aber nicht homogen verteilte AT₁-IR, zeigt, dass einzelne Bereiche des Ependyms für Liquor-ANG II sensitiv sind. Die deutlichen Immunfärbungen im Zytoplasma sprechen sogar für eine Aufnahme von Liquor-ANG II. Sie können auf der anderen Seite aber auch als Zeichen für eine ANG II-Produktion oder -Speicherung innerhalb dieser Zellen gewertet werden. Als nachgewiesen gilt der Effekt von ANG II auf die Liquor-Produktion in Hasen und Ratten. Hier wirkt ANG II über seine AT₁-Rezeptoren direkt auf den ChP [20].

Ob über solche Rückkopplungsschleifen tatsächlich Informationen aus beiden RAS bezogen werden, bleibt - auf rein lichtmikroskopische Befunde gestützt - allerdings Spekulation. Eine ultrastrukturelle Analyse muss letztendlich Aufschluss darüber geben ob und inwieweit der ChP für ANG II aus dem Blutkreislauf und/oder Liquor-ANG II empfänglich ist oder diese gar produziert. Darüber hinaus kann ein AT₁-vermittelter bidirektionaler Transport durch das Ependym des ChP, wie er bei anderen Endo- bzw. Epithelien gezeigt wurde, nicht ausgeschlossen werden.

V.5.2.2.3 Der *Liquor cerebrospinalis* als zirkulationsunabhängiges RAS, welches doch von dem überexprimierten Mäusereninen beeinflusst wird

Der *Liquor cerebrospinalis* gilt als zirkulationsunabhängiges RAS. Intravenöse Infusionen konnten zeigen, dass ANG II die Liquor/Blut-Schranke nicht penetriert [107] und dass trotz erheblichen Variationen der ANG II-Konzentration im Blutkreislauf nur geringe Schwankungen in der Liquor-ANG II-Konzentration vorliegen [18]. Bekräftigt wurde die Annahme eines eigenständigen RAS durch De- und Rehydrationsexperimente. Diese konnten zeigen, dass ANG II-Konzentrationen im Plasma und im *Liquor cerebrospinalis* mit der Austrocknung der Versuchstiere ansteigen, nach deren Rehydratation jedoch nur die ANG II-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* innerhalb kurzer Zeit sinkt [113].

Die Interaktionen zwischen Liquor-ANG II und Gehirn-ANG II sind dagegen noch weitgehend unklar. Die hier beschriebenen Beobachtungen im Ependym des 3.Ventrikels deuten jedoch darauf hin, dass ANG II durch die Wände der Hirnventrikel transportiert wird. Da Liquor-ANG II, teilweise im Gehirn gebildet wird, ist sein Transport durch das Ependym in Richtung der Ventrikel unumgänglich [109]. Da eine funktionelle Liquor/Hirn-Schranke im

überwiegenden Teil der Ventrikelauskleidung fehlt [106], ist neben dem aktiven Transport durch das Ependym auch eine passive Diffusion durch die ependymale Naht denkbar.

Alle bisherigen Befunde sprechen zwar dafür, dass Liquor-ANG II weitestgehend als von der Zirkulation unabhängiger Mediator der Osmoregulation fungiert [18, 110]. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Dichte und Verteilung der AT₁-Rezeptoren, im Ependym des ChP bei TGR deutlich geringer ist als bei SDR. Dies, deutet auf eine verminderte Rezeptivität des ChP gegenüber Liquor-ANG II hin, kann aber insbesondere auch als Indikator für eine Reduktion der Liquor-ANG II-Synthese im ChP von TGR gewertet werden. Damit wäre ein maßgeblicher Effekt des überexprimierten Mäuserenings auf die lokalen RAS im ZNS nicht nur im Gehirn-RAS zu suchen, sondern auch im Liquor-RAS der Hirnventrikel. Dieses RAS scheint auf die erhöhte Konzentration von ANG II im Blutkreislauf mit einer Drosselung der ANG II-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* zu antworten.

V.5.2.3 Das Ependym der Hirnventrikel reguliert die Einflüsse von Liquor-ANG II auf das ‚Zentrale Nervensystem‘

In der Testphase dieser Arbeit konnten erstmalig ANG II- und AT₁-IR im Ependym des 3.Ventrikels von SDR auf ultrastruktureller Ebene gezeigt werden. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse bekräftigen die auf den lichtmikroskopischen Befunden gestützte Vermutung, dass zumindest Teile des Ependyms für Liquor-ANG II rezeptiv sind.

Das Ependym des 3.Ventrikels kommt also als regulatorisches Element für einen möglichen bidirektionalen Transport zwischen Liquor und extrazelluläre Flüssigkeit und umgekehrt - bedingt durch aktive Endo- und Exozytose und passive Diffusion - in Betracht. Lichtmikroskopische Befunde lassen den Schluss zu, dass große Teile des Ependyms des 1. und 2.Ventrikels für ANG II sensitiv sind und ebenfalls eine regulatorische Funktion zwischen Liquor- und Gehirn-ANG II innehaben.

Die Wirkungen von Liquor-ANG II im Gehirn sind noch weitestgehend unbekannt. Bisher konnten intracerebroventrikuläre Infusionen von ANG II eine Erhöhung von AT₁-Rezeptoren im Gehirn von 3-4 Wochen alten Ratten zeigen [94]. Veränderungen des AT₁-Rezeptors in Affinität und Menge ließen sich bei ausgewachsenen Tieren allerdings nicht nachvollziehen [114]. Als gesichert gilt, das Liquor-ANG II durch das Ependym des 3.Ventrikels den *Nucleus medianus* in der präoptischen Region erreicht, wo es über seine Rezeptoren auf das Trinkverhalten einwirkt [80, 88].

V.5.2.4 Supraependymale Phagozyten auf dem Ependym der lateralen Ventrikel - überwacht das Immunsystem die Konzentrationen von ANG II im *Liquor cerebrospinalis*?

Die Beobachtung supraependymaler Zellen an den dorsolateralen Wänden des 1. und 2. Ventrikels lässt auf die Existenz intraventrikulärer Makrophagen schließen. Diese konnten bereits auf dem Ependym der lateralen Ventrikel normotensiver Ratten gezeigt werden [63]. Die Betrachtung der von massiven DAB-Niederschlägen markierten Zellen verleitet zu der Annahme, dass es sich bei den beobachteten Zellen um große supraependymale Makrophagen, ähnlich den Epiplexuszellen auf dem Ependym des ChP, mit ungewöhnlich gehäuften membranständigen und zytoplasmatischen ANG II-Bindungsstellen handelt. Diese Annahme konnte durch bisherige Methylenblaufärbungen jedoch nicht bestätigt werden. Ob die immunreaktiven Aufwölbungen des Ependyms identisch mit den identifizierten Hohlräumen in der Ventrikelwand sind oder tatsächlich supraependymale, mononukleare Makrophagen darstellen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die unmittelbare Nähe der potentiellen Makrophagen, aber auch der Hohlräume zum Gefäßsystem, das dem Ependym netzartig unterliegt, erweckt zumindest den Eindruck einer funktionellen Anbindung an das Blut- oder/und Lymphgefäßsystem. Ursprung und Funktion dieser ependymalen Hohlräume und der darin befindlichen Zellen sind allerdings noch unbekannt.

V.5.2.5 Tanyzyten im Ependym des 3. Ventrikels überwachen die ANG II-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* und verbinden das Liquor-RAS mit Gehirn- und Blutkreislauf-RAS

Die erstmalige Darstellung von AT₁-IR Tanyzyten im Ependym des 3. Ventrikels von SDR⁴⁴ (außerhalb des OvLT) zeigt darüber hinaus, dass Liquor-ANG II mit hoher Wahrscheinlichkeit von diesen Neurogliazellen aus dem Liquor aufgenommen und über deren lange Fortsätze in den Hypothalamus gelangt. Heutige Hypothesen sehen die Aufgabe der Tanyzyten in der Überwachung der Peptidspiegel im *Liquor cerebrospinalis* und der Freisetzung von Hormonen im Hypothalamus. Es wird vermutet, dass Tanyzyten einen Peptidtransport zu Gehirnblutgefäßen, Nervenfasertrakten und Kerngebieten im Hypothalamus etabliert haben [135]. Bis jetzt konnten Somatostatin2(a)-Rezeptoren [38] und Dopamin aktivierte D₁-Rezeptoren in ependymalen Tanyzyten dargestellt werden [135]. Darüber hinaus gelang der Nachweis der Expression der Glutamattransporten GLT-1 und GLAST in Tanyzyten des 3. Ventrikels [8].

⁴⁴ AT₁-immunreaktive Tanyzyten wurden bei TGR ebenfalls identifiziert aber weder qualitativ noch quantitativ in dieser Arbeit erfasst.

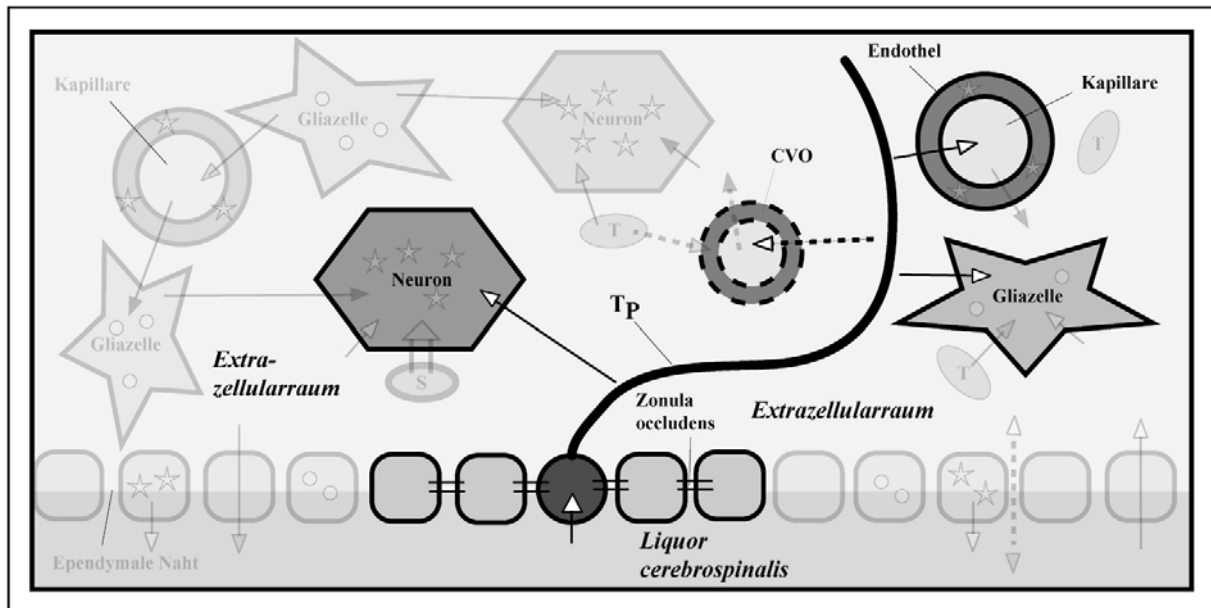


Abb.66: Tanyzyten im Ependym des 3.Ventrikels kontrollieren die ANG II-Konzentration im Liquor.

Ausschnitt aus Abb.61 demonstriert die Aufnahme von Liquor-ANG II durch einen Tanyzyten. Liquor-ANG II wird aktiv in das Perikaryon des Tanyzyten aufgenommen (Endozytose, breiter weißer Pfeil) und dann durch den axonartigen Fortsatz in einem Hormon/Rezeptor-Komplex bis weit in die periventriculäre Region verbracht. Von den Tanyzytenfortsätzen wird Liquor-ANG II dann in den Extrazellularraum freigesetzt und wirkt auf Neurone und Gliazellen oder auf ‚unfensterte‘ (weiße Pfeile) oder ‚gefensterter‘ Kapillaren (gestrichelter weißer Pfeil). Das den Tanyzyten umgebende Ependym schirmt die dahinter liegenden Areale durch *Zonulae occludentes* von passiven Transportprozessen ab. Abkürzungen: wie zuvor.

Der Befund von AT_1 -immunreaktiven Tanyzytenfasern, welche in die retrochiasmatische Region projizieren, ist in sofern von Interesse, da der SCN seinerseits - mitunter auch Vaso-IR - Faserverbindungen in die retrochiasmatische Region unterhält [53]. Es ist also nicht auszuschließen, dass afferente und/oder efferente Fasern des SCN Kontakt zu den Tanyzytenfortsätzen in der retrochiasmatischen Region unterhalten. Über diese könnten dann Informationen über den ANG II-Spiegel im *Liquor cerebrospinalis* an den SCN weitergeleitet werden. Eine neuromodulatorische Wirkung auf SCN- und andere Fasertrakte in der retrochiasmatischen Region durch Freisetzung von Liquor-ANG II aus Tanyzytenfortsätzen erscheint aber ebenfalls sehr wahrscheinlich.

Die massive AT_1 -IR in den Perikarya der Tanyzyten lässt vermuten, dass Liquor-ANG II von diesen aufgenommen wird. Die durchgängige Markierung der Zellfortsätze weist auf einen vesikelgebundenen AT_1 -vermittelten ANG II-Transport hin. Die unmittelbare Nähe der Zellfortsätze zu AT_1 -IR-Kapillaren im Hypothalamus macht die Existenz eines Transport- und Kommunikationsweges für ANG II zwischen dem *Liquor cerebrospinalis* und der Blutzirkulation wahrscheinlich. Gestützt wird diese Hypothese durch frühere Darstellungen von ANG II-IR Tanyzytenfortsätzen in der retrochiasmatischen Region [25]. Auch weisen

frühere Studien auf ANG II-Bindung und -Transport in ependymalen Tanyzyten in der Nähe des OvLT hin [91].

V.5.3 ANG II - ein Octapeptid als regulierender Faktor der Proteinsynthese und der Genexpression

V.5.3.1 ANG II startet intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden über seine AT₁-Rezeptoren im Zytosol

Die Existenz von intrazellulärem ANG II etlichen Jahren bekannt und die Theorie vom intrazellulären Transport des Octapeptids in einem vesikelgebundenen Hormon/Rezeptor-Komplex findet mittlerweile in Fachkreisen allgemeine Anerkennung. Im Gegensatz zu seiner Wirkung durch AT₁-Rezeptoren in der Zellmembran, die auf der Induktion einer schnellen Signaltransduktionskaskade beruht, ist seine funktionelle Bedeutung im Zytosol und im Kernplasma noch weitgehend unklar. Neben der Vermutung, dass der intrazelluläre Hormon/Rezeptor-Komplex an der Runterregulierung und der Desensitivisierung der Zelle beteiligt ist, verdichten sich die Hinweise auf die Existenz von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden, welche von ANG II durch AT₁-Rezeptoren im Zytosol induziert werden [Übersicht in 46].

Als mittlerweile gesichert gilt die Wirkung von intrazellulärem ANG II auf die Ca⁺⁺-Signal Generierung im Zytosol. So konnten intrazelluläre Studien die Wirkung von injiziertem ANG II auf die Ca⁺⁺-Signal Generierung im Zytosol von injizierten Zellen nachweisen. Darüber hinaus wurde ebenfalls gezeigt, dass die Injektion von ANG II in vaskuläre glatte Muskelzellen ein Ca⁺⁺-Signal in den Nuklei dieser Zellen generiert [37].

ANG II stimuliert darüber hinaus die Proteinsynthese im Herz, der Nebenniere und der Leber. Es ist Zurzeit jedoch unklar, ob dieser Effekt durch einen direkten Einfluss des Octapeptids auf der Ebene des Kerns zustande kommt, oder aus einer ‚second messenger‘-Signaltransduktion im Zytosol resultiert [86].

V.5.3.2 ANG II verändert die Konformation von Chromatin und stimuliert die RNA-Synthese

Frühere Studien konnten belegen, dass ANG II Konformationsänderungen von Chromatin in isolierten Zellkernen der Rattenleber verursacht und die RNA-Synthese erhöht [97, 99]. Hierbei soll die Stimulation der RNA-Synthese auf einer ANG II-induzierten Stimulation der *Messenger*-RNA-Polymerase II beruhen [97]. Weiterführende Studien zur Bindung und zur Wirkung von ANG II auf Chromatin sind allerdings nicht verfügbar.

V.5.3.3 AT₁-Rezeptoren im Kernplasma vermitteln den Effekt von ANG II auf die Proteinsynthese und die Genexpression

Neben seiner nachgewiesenen hohen Affinität zu Chromatin, bindet ANG II auch an im Kernplasma befindliche AT₁-Rezeptoren, die sich allerdings in ihren Eigenschaften von den bislang bekannten membranständigen AT₁-Rezeptoren unterscheiden müssen, und wirkt dann auf der Ebene des Zellkerns [10, 97, 98]. Hierbei wirkt das Octapeptid nicht nur auf die Genexpression, sondern auch auf die Proteinsynthese. So konnten Untersuchungen an Zellkulturen der glatten Muskulatur nachweisen, dass ANG II die Proteinsynthese dieser Zellen stimuliert und das Zellwachstum, jedoch nicht die Zellproliferation fördert. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die ANG II-induzierte Hypertrophie eine wichtige Rolle im abnormen Zellwachstum von glatten Muskelzellen spielt, das in einigen Formen der Hypertonie auftritt [9].

Auf der Ebene der Genexpression konnten bereits mehrere ANG II-induzierte Wirkungen nachgewiesen werden. So aktiviert ANG II über den *Nuclear Factor- κ B* die Bildung von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur sowie die Expression von Zytokinen in letzteren. Ein Effekt von ANG II auf *Cell cycle regulation genes* über die Transkriptionsaktivatoren *API* und *STAT* in Hepatozyten, cardialen Fibroblasten und cardialen Myozyten sowie anderen Zellen konnte ebenfalls demonstriert werden [Übersicht in 12].

V.5.3.4 ANG II reguliert seine eigene Genese

Der wohl wichtigste Befund zur Wirkung von ANG II auf die Genexpression, liegt in der Entdeckung des ANG II über die Aktivierung des *Nuclear Factor- κ B* die Resynthese seines eigenen Vorläufers Angiotensinogen anregt (positive *Feedback*-Schleife). So berichten Studien über eine von ANG II ausgelöste Erhöhung der Angiotensinogen-mRNA Mengen und von der Stimulation der Angiotensinogenproduktion in Leber und Niere [41, 77]. Ein nachweislicher Effekt von ANG II auf die Angiotensinogen-mRNA-Synthese bzw. die Angiotensinogenproduktion in neuronalem Gewebe ist bis jetzt leider nicht verfügbar. Das erhöhte Aufkommen von ANG II-IR im Zytosol und im Kernplasma von distinkten Neuronen im SCN macht es allerdings wahrscheinlich, dass ANG II auch in neuronalem Gewebe die Produktion seines Vorläufers reguliert, zumal dieser in den betroffenen Neuronen auf direktem Weg intrazellulär über Tonin und Cathepsin G in ANG II degradiert werden kann und ANG II-Genese somit nicht auf die extrazelluläre Spaltung von Angiotensinogen bzw. ANG I angewiesen ist [21, 52].

V.5.4 ANG II - ein vielseitiges Neuropeptid im zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik und sein Einfluss auf die circadiane Rhythmik des Blutdrucks

V.5.4.1 ANG II stimuliert die Freisetzung von Vasopressin im SCN

Die elektronenmikroskopischen Befunde zur ANG II-IR im SCN von normotensiven SDR konnten nachweisen, dass ANG II im Zytosol und im Kernplasma von distinkten Neuronen im zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik akkumuliert und hier wahrscheinlich auch gebildet wird. Die Ergebnisse zur ANG II-IR und die AT₁-IR im Neuropil des SCN machen darüber hinaus deutlich, dass ANG II hier als Neurotransmitter an synaptischen Verbindungen zwischen den Neuronen fungiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ANG II an axonalen Terminalen ohne Synapsen eine Rolle als Neuromodulator ausübt. Die hieraus resultierenden Effekte werden - zumindest teilweise - von AT₁-Rezeptoren vermittelt. Die elektronenmikroskopischen Befunde zeigen also die Mechanismen mit denen ANG II durch das Neuropil transportiert bzw. mit denen seine Effekte auf einzelne Komponenten innerhalb des SCN vermittelt werden. Isoliert betrachtet, lassen sie allerdings keine weiterführenden Schlüsse auf die Funktionalität, sprich die eigentliche Wirkungsweise des Octapeptids ANG II im SCN zu.

Die Verbindung mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen zum Vorkommen des Octapeptids und seiner AT₁-Rezeptoren sowie der Vasopressin-IR im SCN macht eine weiterreichende funktionelle Betrachtung von ANG II möglich. Mittlerweile gilt es als gesichert, dass ANG II über seine zellmembranständigen AT₁-Rezeptoren, über die Induktion von schnellen Signaltransduktionskaskaden die Ausschüttung des Hormons Vasopressin stimuliert [29, 132]. Dies konnte für andere Kerngebiete im Hypothalamus (z.B. den PVN und den SON) sowie in der Hypophyse bereits nachgewiesen [1, 50, 52]. Die starken intrazellulären Vasopressin-IR einzelner Neurone in der Schalen-Region des SCN lassen vermuten, dass der zentrale Schrittmacher der circadianen Rhythmik, ähnlich wie der PVN und der SON, an der Ausschüttung von Vasopressin im Hypothalamus - einem Hormon, welches mitunter Blutdruck erhöhende Funktion hat - beteiligt ist [1, 50].

V.5.4.1.1 Die Freisetzung von Vasopressin und die Produktion von SCN-ANG II in ein und demselben Neuron?

Die massive Akkumulation von ANG II-IR in einzelnen Neuronen des SCN macht es wahrscheinlich, dass ANG II in ihnen gebildet wird und von hieraus seinen Einfluss auf jene Neurone ausübt die Vasopressin ausschütten. Hierbei könnte ANG II intrazellulär in einem Hormon/Rezeptor-Komplex zu axonalen Terminalen ohne synaptische Spezialisierung

gebracht werden und in der direkten Umgebung von Vasopressin produzierenden Perikarya in den Extrazellularraum entlassen werden, von wo aus das Octapeptid auf die AT₁-Rezeptoren in der Zellmembran wirken könnte. ANG II verursacht an den Rezeptoren dann eine Konformationsänderung die eine schnelle Signaltransduktionskaskade in dem betreffenden Neuron auslöst und in der vermehrten Synthese bzw. Ausschüttung von Vasopressin resultiert.

Die hier demonstrierte ANG II-IR in den distinkten Neuronen des SCN entspricht zwar in ihrem intrazellulären Erscheinungsbild den beschriebenen, aber nicht photographisch belegten Ergebnissen einer Studie zur ANG II-IR im SCN von C57/6J Mäusen. Die Lokalisation der dort beschriebenen Neurone ist jedoch nicht deckungsgleich mit den hier gezeigten Neuronen aus dem SCN von normotensiven SDR [1]. Dies mag einerseits auf artspezifische Unterschiede zurück zuführen sein, ist aber vermutlich eher das Ergebnis unterschiedlicher Antikörper und alternativen immunhistologischen Methoden. Bisher ist es nicht gelungen eine Verbindung aus ANG II-haltigen Fasern zwischen ANG II- und Vasopressin-produzierenden Neuronen zu dokumentieren. Unter der Annahme, dass ANG II innerhalb des neuronalen Netzwerkes aktiv in einem Hormon/Rezeptor-Komplex transportiert wird, sollten solche Fasern anhand von AT₁-Rezeptorfärbungen jedoch lokalisierbar sein.

Alternativ zu einer solchen ANG II-haltigen neuronalen Verbindung, die einen direkten Einfluss von ANG II-produzierenden Neuronen auf die Ausschüttung von Vasopressin belegen könnten, ist die These in Betracht zu ziehen, dass die Genese von ANG II und Vasopressin im SCN in ein und denselben Neuronen erfolgt. Dies wird zumindest durch eine Untersuchung an Neuronen des PVN und SON bekräftigt, die eine Kolokalisation von ANG II und Vasopressin in ein und demselben Neuron zeigen konnten [50].

V.5.4.2 Die funktionelle Blut/Hirn-Schranke im SCN scheint auch bei TGR vorhanden

Die hier beschriebenen Befunde zur AT₁-IR in den perivaskulären Regionen der Kapillaren im SCN machen es wahrscheinlich, dass ANG II aus der Zirkulation nicht verstärkt durch das Endothel in den SCN gelangt. Vielmehr scheint die Blut/Hirn-Schranke im SCN funktionsfähig und die Ergebnisse geben keinen Hinweis darauf, dass ANG II aus der Zirkulation vermehrt über aktive Rezeptorvermittelte Transportmechanismen in das Neuropil des SCN gelangt.

Allerdings sind die Immunsignale in den perivaskulären Regionen von SDR und TGR zu fein um einen vielleicht gering erhöhten Transport von ANG II aus der Zirkulation anhand der Rezeptorlokalisierung auszuschließen. Das Fehlen von auffälligen Veränderungen in der Dichte

und Verteilung der AT₁-Rezeptoren macht eine vermehrte Passage von ANG II durch das Endothel jedoch unwahrscheinlich.

V.5.4.3 ANG 1-7 - ein möglicher Konkurrent in der Regulation des Blutdrucks und bei der Freisetzung von Vasopressin zeigt Variationen seiner Dichte im SCN

Ähnlich der hier gezeigten ANG II-IR im SCN, konnte auch eine Akkumulation von ANG 1-7 in SCN-Neuronen beobachtet werden. Die Lokalisation der ANG 1-7-IR ist jedoch nicht deckungsgleich mit den hier beschriebenen Befunden zur ANG II-IR und ist auch nicht wie die Vasopressin-IR auf Schalen-Bereich des SCN begrenzt [54]. Bisherige Studien sehen das Heptapeptid ANG 1-7 als Konkurrent des ANG II in der Vasopressinausschüttung und der Regulation des Blutdrucks und sprechen ihm darüber hinaus auch eine Funktion als Neuromodulator an neuronalen Fasern und Terminalen zu. Seine Wirkung wird hierbei ebenfalls von den AT₁-Rezeptoren vermittelt [52, 104]. Die Mechanismen seiner Genese sind allerdings noch nicht aufgeklärt, so dass der Einfluss des in der Nebenniere übermäßig produzierten Renins auf dieses Heptapeptid noch weitgehend unbekannt ist. Die divergente Lokalisation spricht jedoch für eine funktionsmorphologische Trennung bzw. Teilung beider Neuropeptide im SCN.

Der Vergleich der ANG 1-7-IR im Hypothalamus von TGR(mREN2)27 und SDR zeigte zwar keine Unterschiede in der Verteilung der Immunreaktivität, lies allerdings eine dichtere Färbung in den transgen-hypertensiven Tieren erkennen [54]. Die erhöhte Dichte von ANG 1-7 im SCN von TGR gegenüber den Kontrolltieren deutet darauf hin, dass sich die ANG 1-7-Konzentration im SCN bei TGR zum Zeitpunkt ihres maximalen Blutdrucks ebenfalls auf einem hohen Niveau - entgegengesetzt phasenverschoben zu SDR - befindet.

Der Befund, dass die funktionelle Blut/Hirn-Schranke des SCN-Kapillarsystems auch bei TGR weitgehend intakt erscheint, lässt darauf schließen, dass die ermittelten Immunreaktivitäten im SCN dieser Tiere großteils auf im SCN bzw. im Gehirn produzierte Angiotensine zurück zuführen sind. Das Ergebnis lässt also eine Verknüpfung zwischen Blutdruckniveau und Konzentration der an seiner Entstehung beteiligten Peptide im SCN vermuten und ist demzufolge vielleicht auch auf ANG II übertragbar.

V.5.4.4 Kontrolliert der zentrale Schrittmacher die circadiane Rhythmik des Blutdrucks mit einer rhythmischen Genese von ANG II?

Die Hypertonie der TGR wird maßgeblich durch das vermehrt im Blutkreislauf gebildete Octapeptid ANG II verursacht, welches als Vasokonstriktor direkt und durch die Freisetzung von Vasopressin indirekt auf die Erhöhung des Blutdruckes wirkt. Bei TGR liegt der Blutdruck entgegengesetzt phasenverschoben zur Herzfrequenz und Aktivität und hat sein höchstes Niveau somit in der Schlafperiode dieser Tiere. In der Hochphase des Blutdruckes sollte demzufolge sowohl die Konzentration von ANG II im Blutkreislauf, als auch die Konzentration von Gehirn-ANG II deutlich höher sein als in der Tiefphase des Blutdrucks.

Unter der Annahme, dass der zentrale Schrittmacher der circadianen Rhythmik den Blutdruck über Mechanismen (z.B. die ANG II-Konzentration) in seinem eigenen Gewebe steuert, oder diese Mechanismen hier zumindest ihren Ausgangspunkt haben, könnte sich dies in einer rhythmischen Veränderung der SCN-eigenen ANG II-Konzentration widerspiegeln. So könnte ANG II im SCN beispielsweise rhythmisch produziert und an vasopressinfreisetzende Neurone abgegeben werden. Das circadiane Signal könnte alternativ aber auch über ANG II-haltige Fasern zu anderen Orten der Vasopressinausschüttung im Hypothalamus (z.B. PVN und SON) und der Hypophyse transportiert werden. Darüber hinaus, besteht aber auch die Möglichkeit, dass SCN-ANG II zusätzlich über die Endothelien der Kapillaren in den Blutkreislauf gelangt.

Etwaige Veränderungen der ANG II-Konzentration müssten sich auf die von dem Gehirn-RAS bereitgestellten AT_1 -Rezeptoren im SCN, die ANG II-Effekte vermitteln, auswirken und dort messbar sein. Hierbei muss jedoch auch Berücksichtigt werden, dass die AT_1 -Rezeptoren auch von der Konzentration des Heptapeptids ANG 1-7 beeinflusst werden könnten, dass im SCN von TGR in ihrer Ruhephase vermehrt erscheint. Aufgrund der phasenverschobenen Hypertonie der TGR wäre der maximale Unterschied in der ANG II-Konzentration bzw. in der Dichte und Verteilung der AT_1 -Rezeptoren im SCN in der Mitte der Schlafperiode beider Rattenstämme zu erwarten.

V.5.4.4.1 Dichte und Verteilung der AT_1 -Rezeptoren im Neuropil des SCN geben keinen Aufschluss über die Phasenverschiebung des Blutdrucks bei transgen-hypertensiven Ratten

Die hier beschriebenen Befunde zur AT_1 -IR im Neuropil von SDR und TGR zeigen, dass bei beiden Rattenstämmen die Dichte und Verteilung an neuronalen und glialen Strukturen im SCN ausgesprochen gering ist. Entgegengesetzt zur erwarteten Diskrepanz zwischen normotensiven und transgen-hypertensiven Ratten, zeigt die Lichtmikroskopie eine

gleichmäßige Verteilung der AT₁-Rezeptoren im Neuropil des SCN bei beiden Rattenstämmen.

Unter der Voraussetzung, dass sich die ANG II-Konzentration im SCN in der Dichte und Verteilung seiner AT₁-Rezeptoren widerspiegelt, ist Theorie einer rhythmischen Veränderung der ANG II-Konzentration im Neuropil des SCN anhand der vorliegenden Befunde nur schwierig aufrecht zu erhalten. Etwaige Veränderungen, die durch die beschriebene Erhöhung der ANG 1-7-Konzentration zu vermuten waren, lassen sich durch die Untersuchungen der AT₁-Rezeptoren nicht verifizieren. Die beschriebenen Ergebnisse machen es vielmehr wahrscheinlich, dass der SCN die Regulierung des Blutdrucks weder über die eine erhöhte Konzentration von ANG II oder ANG 1-7 in seinem eigenen Neuropil noch über einen vermehrten Fasergebundenen Transport beider Neuropeptide zu anderen Kerngebieten steuert. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Dichte und die Verteilung der AT₁-Rezeptoren vielleicht nicht im angenommenen Maße die Konzentration von ANG II im SCN widerspiegeln, d.h. einer erhöhten Konzentration des Peptids folgt möglicherweise nicht zwangsläufig auch eine Bereitstellung seiner Rezeptoren in höherer Quantität. Alternativ könnte die vorhandene Menge an ANG II zwar mehr Rezeptoren gleichzeitig binden, wie zu anderen circadianen Zeiten, die Anzahl der wieder zur Verfügung gestellten Bindungsstellen würde aber im nur vorgegebenen quantitativen Rahmen, vielleicht aber in höherer Frequenz, bereitgestellt werden. In diesem Fall bietet der zeitlich fixierte und eng begrenzte Ausschnitt eines immunhistologischen Präparates keine wirkliche Erfassung des Verhältnisses zwischen Peptid und Rezeptor.

Letztendlich muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass die erhöhte Konzentration von ANG II im Blutkreislauf nur als ursächlich für die Entwicklung der Hypertonie angesehen werden kann, ANG II aber nicht gezwungenermaßen als ‚Werkzeug‘ der circadianen Regulation des Blutdrucks durch den SCN angesehen werden darf. Für letzteres liegen zumindest noch keine Nachweise vor. Zumindest gilt es heute als gesichert, dass der SCN den Blutdruck auch bei TGR rhythmisch reguliert. Dies konnte nach dem Entfernen des SCN durch Läsionen gezeigt werden, d.h. die Hypertonie der TGR blieb zwar erhalten, die circadiane Rhythmik des Blutdruckes ging allerdings verloren [134]. Daraus folgt, dass der zentrale Schrittmacher der circadianen Rhythmik nicht primär für die Steigerung des Blutdruckprofils verantwortlich ist, sondern vielmehr die Senkung des Blutdrucks steuert. Warum die Tagesrhythmik bei transgen-hypertensiven Ratten allerdings um 180° phasenverschoben zur Blutdruckrhythmik der normotensiven Ratten ist, ist bis heute unklar.

VI. AUSBLICK UND OFFENE FRAGEN

Im Rahmen dieser Dissertation konnte eine immunhistologische Technik entwickelt werden, die eine zuverlässige Lokalisation von Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems im *Nucleus suprachiasmaticus* der Ratte auf elektronenmikroskopischer Ebene erlaubt. Basierend auf dieser Technik können nun mit Hilfe von weiterführenden Studien offen gebliebene Fragen zu den Renin-Angiotensin-Systemen im zentralen Schrittmacher der circadianen Rhythmik, und ihren Einfluss auf die circadiane Rhythmik des Blutdrucks, bzw. die Freisetzung von Vasopressin bei transgen-hypertensiven TGR(mREN2)27 Ratten beantwortet werden.

Des Weiteren konnte die lichtmikroskopische Inspektion von Hirnarealen vor der Blut/Hirn-Schranke das OvLT sowie das SFO als lohnende Ziele für weiterführende Studien zu Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems ausmachen. Aufgrund ihrer vermuteten ANG II-haltigen neuronalen Verbindungen in den Hypothalamus (zu SCN, SON und PVN) sowie ihres offenen Kapillarsystems scheinen sie als Referenzobjekte zu Kerngebieten hinter der Blut/Hirn-Schranke (z.B. den SCN, SON und PVN) besonders geeignet und sollten bei Untersuchungen nach möglichen Veränderungen in den Renin-Angiotensin-Systemen von TGR(mREN2)27 Ratten Verwendung finden.

Letztendlich sind viele Fragen offen geblieben, deren Beantwortung speziell für die Erforschung der einzelnen Renin-Angiotensin-Systems und ihrer Interaktion, aber auch allgemein für das Verständnis der circadianen Blutdruckregulation von Bedeutung ist:

Fragekomplex: **Die circadiane Rhythmik des Renin-Angiotensin-Systems**

> *Schwankt die Konzentration von ANG II und seiner AT₁-Rezeptoren im Gehirn von normotensiven Tieren im Tagesgang, d.h. verläuft die Synthese von ANG II sowie die Bereitstellung der AT₁-Rezeptoren synchron zur circadianen Rhythmik des Blutdruckes?*

> *Resultieren Veränderungen in der Konzentration von ANG II sowie der Dichte und Verteilung seiner AT₁-Rezeptoren im Gehirn von transgen-hypertensiven TGR aus der allgemein erhöhten ANG II-Konzentration im Blutkreislauf oder folgen sie in ihrer circadianen Rhythmik der entgegengesetzt phasenverschobenen Rhythmik der Hypertonie?*

Mögliche Ansätze:

Immunhistologische Untersuchungen an normotensiven Ratten müssen zeigen, ob die Konzentration von ANG II und die Dichte und Verteilung der AT₁-Rezeptoren im Gehirn bzw. die Bereitstellung der Rezeptoren vor und hinter der Blut/Hirn-Schranke beim gesunden Tier von einer circadianen Rhythmik abhängig ist. Dazu sollten definierte Hirnareale vor (z.B. OvLT, SFO) und hinter der Blut/Hirn-Schranke (z.B. MnPO, PVN und SON) zu definierten Tag/Nacht-Zeiten sowie in beide Dämmerungsphasen auf ihre ANG II-IR und AT₁-IR hin überprüft werden.

Die bei SDR ausgewählten Hirnareale vor und hinter der Blut/Hirn-Schranke müssen bei TGR zu genau denselben circadianen Zeitpunkten auf ihre ANG II und AT₁-IR hin untersucht werden. Nur so lassen sich etwaige rhythmische Schwankungen der ANG II bzw. AT₁-Konzentration im Gehirn von TGR von einer eventuell durch die allgemein erhöhte ANG II-Konzentration verursachte Veränderung des Peptid- und Rezeptorspiegels isolieren.

Fragekomplex: **Die Zirkumventrikularorgane als Tor zwischen zwei RAS**

- > *Sind Veränderungen in Dichte und Verteilung des AT₁-Rezeptors in den Zirkumventrikularorganen von TGR tatsächlich Reaktionen des Gehirn-RAS auf die erhöhte Konzentration von ANG II in der Zirkulation?*
- > *Unterliegen noch andere Komponenten des Gehirn-RAS in diesen ‚offenen‘ Hirnarealen (z.B. Angiotensinogen) Veränderungen?*
- > *Unterhalten die Zirkumventrikularorgane OvLT und SFO zusammen mit dem MnPO ANG II-haltige Verbindungen mit dem SCN?*
- > *Gibt es innerhalb dieser Transport- bzw. Kommunikationswege durch den Einfluss des Transgens der TGR bedingte Veränderungen in RAS-Komponenten?*

Mögliche Ansätze:

Immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen den Vorläufer von ANG I und ANG II müssen zeigen, ob die Synthese von Angiotensinogen durch das Gehirn-RAS von der erhöhten ANG II-Konzentration in der Zirkulation beeinflusst wird. Parallel hierzu können Immunfärbungen mit AT₁-Rezeptor-Antikörpern zeigen, ob die Synthese der Rezeptoren mit der Konzentration von Angiotensinogen korreliert ist.

Parallele immunhistologische Studien mit ANG II- und AT₁-Rezeptor-Antikörpern in den betreffenden Hirnarealen von SDR und TGR müssen zeigen, ob zwischen OvLT, SFO und MnPO und dem SCN ein rezeptorvermittelter Transport von ANG II durch neuronale Fasern existiert. Um heraus zu finden, ob dieser Transport von der Tageszeit abhängt, bzw. bei TGR vielleicht phasenverschoben auftritt, sollten hierzu Tiere beider Rattenstämme zu den vorher definierten circadianen Zeiten verwendet werden.

Fragekomplex: **Der Peptidtransport durch das Endothel von Gehirnbloodgefäßen:**

- > *Bringt die Hypertonie der TGR pathologische Veränderungen der Blutgefäße mit sich, d.h. sind aktive und passive Transportmechanismen von ANG II durch die Gehirnbloodgefäße morphologischen Veränderungen des Endothels unterworfen?*
- > *Ist die Kommunikation zwischen Zirkulations-RAS und Gehirn-RAS im SCN bei TGR verändert, oder ist die Blut/Hirn-Schranke auch bei hypertensiven TGR vollständig funktionsfähig?*
- > *Wie interagieren das RAS der Zirkulation und das RAS des SCN miteinander, d.h. gibt es einen bidirektionalen Transport von ANG II durch das Endothel von Kapillaren im SCN, oder ist der Transfer einseitig?*

Mögliche Ansätze:

Um einen Einblick in die tatsächlichen Transportkapazitäten von ANG II durch die Wände der Blutgefäße im Gehirn von transgen-hypertensiven TGR zu erhalten, müssen elektronenmikroskopische Untersuchungen am Endothel von Kapillaren und größeren Gefäßen mit und ohne funktionelle Blut/Hirn-Schranke bei diesen Tieren zeigen, ob Hypertoniebedingte morphologische Veränderungen, wie beispielsweise eine Verdickung des Endothels oder ein ‚Aufbrechen‘ der *Zonulae occludentes* vorliegen.

Um Informationen über die Transportrichtungen durch das Endothel von SCN-Kapillaren zu erhalten, müssen exozytotische Vesikel von endozytotischen Elementen abgegrenzt bzw. zeitlich eingefroren werden. Dies ist mit einer zusätzlichen Tanninsäurebehandlung möglich, welche die exozytotischen Elemente fixiert und deren Abbauprozesse unterbindet.

Fragekomplex: **Funktionelle Aspekte von ANG II im SCN:**

- > *Wird ANG II tatsächlich in den Neuronen mit massiver intrazellulärer ANG II-IR synthetisiert? Sind ANG II-produzierende Neurone im SCN identisch mit den Neuronen der Vasopressinfreisetzung? Wenn nein, gibt es eine räumliche Aufteilung der Neuronengruppen und wie wird ANG II zwischen ihnen transportiert?*
- > *Unterliegt die Produktion von ANG II im SCN tatsächlich den Schwankungen einer circadianen Rhythmik? Wenn ja, ist sie an die Blutdruckrhythmik gekoppelt und kann diese Kopplung bei Tieren mit phasenverschobenem Blutdruckprofil nachvollzogen werden?*
- > *Ist die Produktion von ANG II bzw. die Freisetzung von Vasopressin im SCN von TGR durch den Einfluss des Transgens der TGR verändert?*
- > *Wird ANG 1-7 im SCN produziert und welche Rolle in der Freisetzung von Vasopressin und der Blutdruckregulation spielt das Heptapeptid ANG 1-7?*

Mögliche Ansätze:

Die intrazelluläre Lokalisation des ANG II-Vorläufers Angiotensinogen innerhalb dieser Neurone, würde ein Synthese von ANG II wahrscheinlich machen.

Die Lokalisation von Vaso-IR und ANG II sollte in Doppelfärbungen - mit unterschiedlichen Markern (DAB und Gold) - im SCN von SDR aufzeigen, ob Vasopressin und ANG II in denselben Neuronen produziert bzw. freigesetzt wird. Eine Beobachtung der ANG II-Produktion in den Neuronen des SCN von SDR und TGR zu definierten Tageszeiten sollte darüber hinaus Aufschluss geben, ob die ANG II-Konzentration im SCN mit der circadianen Rhythmik des Blutdrucks der Tiere schwankt.

Immunhistologische Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene im SCN von TGR müssen zeigen, ob und in welchem Maße sich die Synthese und der Transport von ANG II im SCN der transgen-hypertensiven Tiere von ihren normotensiven Kontrollen unterscheidet. Doppelmarkierungen könnten auch hier eine Kolo-kalisation von Vasopressin und ANG II aufzeigen oder ausschließen.

Das Heptapeptid ANG 1-7 muss, solange seine Wirkungen auf die Blutdruckregulation und die Freisetzung von Vasopressin nicht ausgeschlossen werden können, als funktionelle Komponente und somit möglicher Konkurrent von ANG II angesehen werden. Immunhistologische Doppelmarkierungen müssen zeigen inwieweit ANG 1-7 an AT₁-Rezeptoren bindet und in welchem Konzentrations- und Positionsverhältnis das Heptapeptid zu ANG II im SCN steht. Doppelfärbungen gegen ANG II und ANG 1-7 sollten eine mögliche räumliche Unterteilung der beiden Neuropeptide in der Schalen- oder Kernregion aufzeigen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E.E. Abrahamson and R.Y. Moore, Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections, *Brain Res.* 916 (2001) 172-191.
- [2] A.M. Allen, M.J. McKinley and F.A.O. Mendelsohn, Comparative Neuroanatomy of angiotensin II receptor localization in the mammalian hypothalamus, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 15 (1988) 137-145.
- [3] A.M. Allen, I. Moeller, T.A. Jenkins, J. Zhuo, G.P. Aldred, S.Y. Chai and F.A.O. Mendelsohn, Angiotensin receptors in the nervous system, *Brain Res Bul.* 47 (1) (1998) 17-28.
- [4] F. Alliot, J. Rutin, P.J.M. Leenen and B. Pessac, Brain parenchyma vessels and the angiotensin system, *Brain Res.* 830 (1999) 101-112.
- [5] K. Anderson, T. Murahashi, D. Dostal and M. Peach, Morphologic and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells, *Am J Physiol.* 264 (1993) C179-C188.
- [6] O. Baltatu, J.A. Silva, D. Ganten and M. Bader, The Brain Renin-Angiotensin System Modulates Angiotensin II-Induced Hypertension and Cardiac Hypertrophy. *Hypertension.* 35 (2) (2000) 409-412.
- [7] J.S. Bains and A.V. Ferguson, Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ, *Am J Physiol* 268 (1995) 37 R625-R633.
- [8] U.V. Berger and M. A. Hediger, Differential Distribution of the Glutamate Transporters GLT-1 and GLAST in Tanycytes of the Third Ventricle. *J Comp. Neurol.* 433 (2001) 101-114
- [9] B.C. Berk, V. Vekshtein and H.M. Gordon, Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells, *Hypertension.* 13 (1989) 305-314.
- [10] G.W. Booz, K.M. Conrad, A.L. Hess, H.A. Singer and K.M. Baker, Angiotensin-II-Binding sites on hepatocyte nuclei, *Endocrinology.* Vol 130 6 (1992) 3641-3649.
- [11] S.P. Bottari, M. de Gasparo, U.M. Steckelings and N.R. Levens, Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications, *Front Neuroendocrinol.* 14 (2) (1993) 123-171.
- [12] A.R. Brasier, M. Jamaluddin, Y. Han, C. Patterson and M.S. Runge, Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kB (NF-kB) transcription factor, *Mol Cell Biochem.* 212 (2000) 155-169.
- [13] P. Buma, Synaptic and Nonsynaptic Release of Neurotransmitters in the Central Nervous System, *Acta Morphol Neerl-Scand.* 26 (1988/89) 81-113.
- [14] B. Bunnemann, K. Fuxe, B. Bjelke and D. Ganten, The brain renin-angiotensin system and its possible involvement in volume transmission. In: K. Fuxe, L.F. Agnati (Eds.), *Volume transmission in the brain: novel mechanisms for neural transmission*, Raven, New York, 1991, pp 131-158.
- [15] B. Bunnemann, N. Iwai, R. Metzger, K. Fuxe, T. Inagami and D. Ganten, The distribution of angiotensin II AT1receptor subtype mRNA in the rat brain, *Neurosci Lett.* 142 (1992) 155-158.
- [16] B. Bunnemann, K. Fuxe and D. Ganten, The renin-angiotensin system in the brain: an update 1993, *Regul Pept.* 46 (3) (1993) 487-509.
- [17] S.J. Burwen and A.L. Jones, The association of polypeptide hormones and growth factors with nuclei of target cells, *Trends Biochem Sci.* 12 (1987) 159-162.
- [18] A. Chodobski, J. Szmydynger-Chodobska, M.H. Epstein and C.E. Johanson, The role of angiotensin II in the regulation of blood flow to the choroid plexuses and cerebrospinal fluid formation in the rat, *J Cereb Blood Flow Metab.* 15 (1995) 143-151.

- [19] A. Chodobski, J. Szmydynger-Chodobska and C.E. Johanson, Vasopressin mediates the inhibitory effect of central angiotensin II on cerebrospinal fluid formation, *Eu. J. Pharmacology*. 347 (1998) 205-209.
- [20] A. Chodobski, J. Szmydynger-Chodobska and C.E. Johanson, Angiotensin II regulates choroid plexus blood flow by interacting with the sympathetic nervous system and nitric oxide, *Brain Res.* 816 (1999) 518-526.
- [21] S. Demassieux, R. Boucher, C. Crisé and J. Genest, Purification and characterization of tonin, *Can J Biochem.* 54 (1976) 788-795.
- [22] C.F. Deschepper, J. Bouhnik and W.F. Ganong, Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain, *Brain Res.* 374 (1986) 195-198.
- [23] C. Domínguez-Jiménez, M. Yáñez-Mó, A. Carreira, R. Tejedor, R. González-Amaro, V. Álvarez and F. Sánchez-Madrid, Involvement of $\alpha 3$ integrin/tetraspanins complexes in the angiogenic response induced by angiotensin II, *FASEB J.* Published online April 18 (2001).
- [24] L. Edvinsson, K.C. Nielsen, C. Owman and K.A. West, Adrenergic innervation of the mammalian choroid plexus, *Am J Anat.* 139 (1974) 299-307.
- [25] K. Fuxe, D. Ganten, T. Hökfelt and P. Bolme, Immunohistochemical evidence for the existence of angiotensin II-containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat, *Neurosci Lett.* 2 (1976) 229-234.
- [26] S. Gallinat, S. Busche, M.K. Raizada and C. Sumners, The Angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278 (2000) E357-E374.
- [27] W.F. Ganong, Blood, pituitary and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland, *Front Neuroendocrinol.* 14 (3) (1993) 233-249.
- [28] W.F. Ganong, Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and automatic function, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27 (2000) 422-427.
- [29] M. de Gasparo, K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright and Th. Unger, International Union of Pharmacology.XXIII. The Angiotensin II Receptors, *Pharmacol Rev.* 52 (2000) 415-472.
- [30] D.R. Gehlert, S.L. Gackenhimer and D.A. Schober, Autoradiographic localization of subtypes of angiotensin II antagonist binding in the rat brain, *Neurosci.* 44 (2) (1991) 501-514.
- [31] M.E. Giles, R.T. Fernley, Y. Nakamura, I. Moeller, G.P. Aldred, T. Ferraro, J.D. Penschow, M.J. McKinley and B.J. Oldfield, Characterization of a specific Antibody to the rat Angiotensin II AT₁ receptor, *J Histochem Cytochem.* 47 (4) (1999) 507-515.
- [32] M.E. Giles, D.J. Sly, M.J. McKinley and B.J. Oldfield, Neurons in the lamina terminalis which project polysynaptically to the kidney express Angiotensin AT_{1A} receptor, *Brain Res.* 898 (2001) 9-12.
- [33] K. Griendling, S. Delafontaine, S. Rittenhouse, M. Gimbrone and R. Alexander, Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 262 (1987) 14555-14562.
- [34] P.M. Gross, Circumventricular organ capillaries, *Progress in Brain Res.* 91 (1992) 219-233.
- [35] J.S. Gutkind, M. Kurihara and J.M. Saavedra, Increased angiotensin II receptors in brain nuclei of DOCA-salt hypertensive rats, *Am J Physiol.* 24 (1988) H646-H650.
- [36] J.S. Gutkind, M. Kurihara, E. Castren and J.M. Saavedra, Increased concentration of angiotensin II binding sites in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats, *J Hypertension.* 6 (1988) 79-84.
- [37] H. Haller and F.C. Luft, Angiotensin II acts intracellularly in vascular smooth muscle cells, *Basic Res Cardiol.* 93 Suppl. 2 (1998) 30-36.
- [38] S. H. Hashemi, J. Li, M. Schindler and A. Dahlström, Presence of sst_{2(a)} receptor immunoreactivity in rat ependyma and tanycytes. *Neuroreport.* 12 (9) (2001) 1793-1797.

- [39] W. Häuser, O. Jöhren and J.M. Saavedra, Characterization and distribution of Angiotensin II receptor subtypes in the mouse brain, *Eu J Pharmacology*. 348 (1998) 101-114.
- [40] D.P. Healy and M.P. Printz, Distribution of immunoreactive Angiotensin II, Angiotensin I, angiotensinogen, and rennin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats, *Hypertension*. 6 (1984) I130-I136.
- [41] H. Herrmann and V. Dzau, Feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin angiotensin system, *Circ Res*. 52 (1983) 328-334.
- [42] K.F. Hilgers, E. Bingener, C. Strumpf, D.N. Müller, R. E. Schmieder and R. Veelken, Angiotensinases restrict locally generated angiotensin II to the blood vessel walls, *Hypertension*. 31 (2) (1998) 368-372.
- [43] H. Imboden, J.W. Harding, R.H. Abhold, D. Ganten and D. Felix, Improved immunohistochemical staining of Angiotensin II in rat brain using affinity purified antibodies, *Brain Res*. 426 (1987) 225-234.
- [44] A. Israel, F.M.A. Correa, M. Niwa and J.M. Saavedra, Quantitative determination of angiotensin II binding sites in rat brain and pituitary gland by autoradiography, *Brain Res*. 322 (1984) 341-345.
- [45] J.H. Jhamandas, R.W. Lind and L.P. Renaud, Angiotensin II may mediate excitatory neurotransmission from the subfornical organ to the hypothalamic supraoptic nucleus: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Brain Res*. 487 (1989) 52-61.
- [46] D.A. Jans, Nuclear signalling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors, *FASEB J*. 8 (1994) 841-847.
- [47] E. Jimenez, G.P. Vinson and M. Montiel, Angiotensin II (AII)-binding sites in nuclei from rat liver: partial characterization of the mechanism of AII accumulation in nuclei, *J Endocrinol*. 143 (1994) 449-453.
- [48] C.E. Johanson, Ventricles and cerebrospinal fluid, in: P.M. Conn (Ed.), *Neuroscience in Medicine*, Lippincott, Philadelphia, PA, 1995, pp. 171-196.
- [49] O. Jöhren, H. Imboden, W. Häuser, I. Maye, G.L. Sanvitto and J.M. Saavedra, Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus, *Brain Res*. 757 (1997) 218-227.
- [50] M.M. Kilcoyne, D.L. Hoffman and E.A. Zimmerman, Immunocytochemical localization of angiotensin II and vasopressin in rat hypothalamus: evidence for production in the same neuron, *Clin Sci*. 59 (1980) 57s-60s.
- [51] D.C. Klein, R.Y. Moore and S.M. Reppert, *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. New York: Oxford Univ. Press, 1991.
- [52] H. Kobayashi and Y. Takei, *The renin-angiotensin system, comparative aspects*. Zoophysiology, Vol. 35, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1996.
- [53] M. Kopp, Einfluss des Neuropeptids pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) und des Hormons Melatonin auf intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) der Ratte. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main, 1999.
- [54] H.A. Krob, S.L. Vinsant, C.M. Ferrario and D.P. Friedman, Angiotensin-(1-7) immunoreactivity in the hypothalamus of the (mRen-2d)27 transgenic rat, *Brain Res*. 798 (1998) 36-45.
- [55] B. Lemmer, A. Mattes, M. Böhm and D. Ganten, Circadian blood pressure variation in transgenic hypertensive rats, *Hypertension*. 22 (1993) 97-101.
- [56] B. Lemmer, S. Hauptfleisch and K. Witte, Loss of 24 h rhythm and light induced c-fos mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus of transgenic hypertensive TGR(mREN2)27 rats and effects on cardiovascular rhythms, *Brain Res*. 883 (2000) 250-257.
- [57] B. Lemmer, K. Witte, A. Schänzer and A. Findeisen, Circadian rhythms in the renin-angiotensin system and adrenal steroids may contribute to the inverse blood pressure rhythm in hypertensive TGR(mREN-2)27 rats, *Chronobiol Int*. 17 (5) (2000) 645-658.

- [58] B. Lemmer, K. Witte, H. Enzlinger, S. Schiffer and S. Hauptfleisch, Transgenic TGR(mREN2)27 Rats as a Model for Disturbed Circadian Organization at the Level of the Brain, the Heart, and the Kidneys, *Chronobiol Int.* 20 (4) (2003) 711-738.
- [59] Z. Lenkei, M. Palkovits, P. Corvol and C. Llorens-Cortès, Expression of Angiotensin Type-1 (AT₁) and Type-2 (AT₂) Receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review, *Front Neuroendocrinol.* 18 (1997) 383-439.
- [60] A.Y.-J. Lin, J. Szmydynger-Chodobska, M.P. Rahman, B. Mayer, P.R. Monfils, C.E. Johanson, Y.-P. Lim, S. Corsetti and A. Chodobski, Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in rat anterior choroidal artery, stromal blood microvessels and choroid plexus epithelial cells, *Cell Tissue Res.* 285 (1996) 411-418.
- [61] R.W. Lind, L.W. Swanson and D. Ganten, Organization of Angiotensin II Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Central Nervous System, *Neuroendocrinol.* 40 (1985) 2-24.
- [62] R.W. Lind and A.K. Johnson, Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. *J Neurosci.* 2 (1982) 1043-1051.
- [63] E-A. Ling, C. Kaur and J. Lu, origin, Nature and Some Functional Considerations of Intraventricular Macrophages, With special Reference to the Epilexus Cells, *Microsc Res Tech.* 41 (1998) 43-56.
- [64] D. Lu, H. Yang, G. Shaw and M.K. Raizada, Angiotensin II-Induced Nuclear Targeting of the Angiotensin Type 1 (AT₁) Receptor in Brain Neurons, *Endocrinology.* 139 (1) 1998 365-375.
- [65] M.B. Marrero, B. Schieffer, W.G. Paxton, L. Heerdt, B.C. Berk, P. Delafontaine and K.E. Bernstein, Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor, *Nature.* 375 (1995) 247-250.
- [66] M.J. McKinley, A.M. Allen, M.L. Mathai, C. May, R.M. McAllen, B.J. Oldfield and R.S. Weisinger, Brain angiotensin and body fluid homeostasis, *Jpn J Physiol.* 51 (3) (2001) 281-289.
- [67] M.J. McKinley, R.M. McAllen, G.L. Pennington, A. Smadenca, R.S. Weisinger and B.J. Oldfield, Physiological actions of angiotensin II mediated by AT₁ and AT₂ receptors in the brain, *Clin Exp Pharmacol Physiol. Suppl* 3 (1996) s99 - s104.
- [68] K. Mizuno and S. Fukuchi, A possible role of brain angiotensin II receptor binding in developing hypertension, *Jpn Cric J.* 45 (1981) 1111-1115.
- [69] R.R. Miselis, The Subfornical Organ's Neural Connections and Their Role in Water Balance, *Peptides* 3 (3) (1982) 501-502.
- [70] K. Møllgard, Y. Balslev and N.R. Saunders, Structural aspects of the blood-brain and blood-CSF barriers with respect to endogenous proteins. In: Lj. Rakić, D.J. Begley, H. Davson, B.V. Zloković (Eds.), *Peptide and amino acid transport mechanisms in the central nervous system*, Stockton Press, New York, 1988, pp. 93-101.
- [71] J. Monti, M. Schinke, M. Böhm, D. Ganten, M. Bader and Giampiero Bricca, Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats TGR(ASrAOGEN), *Am J Physiol.* 280 (2001) R233-R240.
- [72] M. Montiel, M.C. Caro and E. Jiménez, Agonist-induced internalisation of the angiotensin II-binding sites from plasma membranes of isolated rat hepatocytes, *J Endocrinol.* 152 (1997) 407-412.
- [73] A.F. Moore and P.A. Khairallah, Binding of ¹²⁵I-angiotensin II to rat brain preparation from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiologist* 20 (1977) 65.
- [74] R.Y. Moore, The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system, *Trends Neurosci.* 5 (1982) 404-407.
- [75] R.Y. Moore, organization of the mammalian circadian system, *CIBA Found Symp.* 183 (1995) 88-99.
- [76] B.A. Mungal, T.A. Shinkel and C. Sernia, Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain, *Neuroscience.* 67 (2) (1995) 505-524.

- [77] A. Nakamura, H. Iwao, K. Fukui, S. Kimura, T. Tamaki, S. Nakanishi and Y. Abe, Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II, *Am J Physiol.* 258 (1990) E1-E6.
- [78] A.B. Novikoff, P.M. Novikoff, N. Quintana and D. Cleveland, Diffusion artifacts in 3,3'-diaminobenzidine cytochemistry, *J Histochem Cytochem* 20 (9) (1972) 745-749.
- [79] N. Obermüller, T. Unger, J. Culman, P. Gohlke, M. de Gasparo and S.P. Bottari, Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei, *Neurosci Lett.* 132 (1991) 11-15.
- [80] B.J. Oldfield, D. Ganten and M.J. McKinley, An ultrastructural analysis of the distribution of angiotensin II in the rat brain, *J Neuroendocrinol.* 1 (1989) 121-128.
- [81] B.J. Oldfield, R.R. Miselis and M.J. McKinley, Median preoptic nucleus projections to vasopressin-containing neurones of the supraoptic nucleus in sheep. A light and electron microscopic study, *Brain Res.* 542 (1991) 193-200.
- [82] B.J. Oldfield, *Neurochemistry of the circuitry subserving thirst.* In: D.J. Ramsey and D.A. Booth (Eds.), *Thirst-physiological and psychological aspects.* Springer, Berlin Heidelberg New York, 1991, pp. 176-193.
- [83] B.J. Oldfield, P.J. Davern, A.M. Allen, E. Badoer and M.J. McKinley, Efferent Neural Projections of Angiotensin Receptor (AT₁) Expressing Neurones in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Rat, *J Neuroendocrinol.* 13 (2001) 139-146.
- [84] G. Pardridge, Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier, *Endocrine Rev.* 7 (1986) 314-330.
- [85] M. Paul, K. Hermann, M. Printz, R.E. Lang, Th. Unger and D. Ganten, The brain angiotensin system: Subcellular localization and interferences with converting enzyme inhibitors, *J Hypertension.* 1 (suppl 1) (1983) 9-15.
- [86] M.J. Peach *Pharmacology of angiotensin II.* In: J.W. Fisher (ed.), *Kidney hormones.* Academic Press, London (1986) Vol 3 274-311.
- [87] J. Pfister, C. Spengler, E. Grouzmann, M.K. Raizada, D. Felix and H. Imboden, Intracellular staining of angiotensin receptors in the PVN and SON of the rat, *Brain Res.* 754 (1997) 307-310.
- [88] M.I. Phillips, Functions of brain angiotensin, *Ann Rev Physiol.* 49 (1987) 413-435.
- [89] M.I. Phillips, L. Shen, E.M. Richards and M.K. Raizada, Immunohistochemical mapping of angiotensin AT₁ receptors in the brain, *Regul Pept.* 44 (1993) 95-107.
- [90] M.I. Phillips and C. Summers, Angiotensin II in central nervous system physiology, *Regul Pept.* 78 (1998) 1-11.
- [91] M.I. Phillips, P.P. Deshmukh and W. Larsen, Morphological comparisons of the ventricular wall of subfornical organ and organum vasculosum of the lamina terminalis, *Scanning Electron Microsc.* 2 (1978) 349-356.
- [92] V.M. Pickel, J. Chan and D. Ganten, Dual Peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ, *J Neurosci.* 6 (8) (1986) 2457-2469.
- [93] Chr.W. Pool, R.M. Buijs, D.F. Swaab, B.J. Boer and F.W. van Leeuwen, On the way to a specific immunocytochemical localization. In: A.C. Cuervo (Ed.), *Immunohistochemistry.* John Wiley, London, 1983, pp. 1-46.
- [94] J.P. Porter, Chronic intracerebroventricular infusion of angiotensin II increases brain AT₁ receptor expression in young rats, *Dev. Brain Res.* 112 (1999) 293-295.
- [95] M.P. Printz, Regulation of the brain angiotensin system: a thesis of multicellular involvement, *Clin Exp Hypertens. Theory and Practice.* 10 (1) (1988) 17-35.

- [96] M.K. Raizada, T.F. Muther and C. Summers, Increased angiotensin II receptors in neuronal cultures from hypertensive rat brain, *Am J Physiol.* 247 (1984) C364-C372.
- [97] R. Re, M. Parab, Effects of angiotensin II on RNA synthesis by isolated nuclei, *Life Sci.* 34 (1984) 647-651.
- [98] R.N. Re, A.A. McPhee and J.T. Fallon, Specific nuclear binding of angiotensin II by rat liver and spleen nuclei. *Clin Sci.* 61 (1981) 245S-247S.
- [99] R.N. Re, R.A. LaBiche and S.E. Bryan, Nuclear hormone mediated changes in chromatin solubility, *Biochem Biophys Res Commun.* 110 (1983) 61-68.
- [100] R.N. Re, D.L. Vizard, J. Brown and S. Bryan, Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease, *Biochem Biophys Res Commun.* 119 (1984) 220-227.
- [101] A.L. Jr. Robertson and P.A. Khairallah, Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle, *Science* 172 (1971) 1138-1139.
- [102] J.M. Saavedra, F.M.A. Correa, L.M. Plunkett, A. Israel, M. Kurihara and K. Shigematsu, Binding of angiotensin and atrial natrial peptide in brain of hypertensive rats, *Nature* 320 (1986) 758-760.
- [103] J.M. Saavedra, A. Israel, L.M. Plunkett, M. Kurihara, K. Shigematsu and F.M.A. Correa, Quantitative distribution of angiotensin II binding sites in rat brain by autoradiography, peptide 7 (1986) 679-687.
- [104] J.M. Saavedra, Emerging features of brain angiotensin receptors, *Regul Pept.* 85 (1999) 31-45.
- [105] J. Sadoshima, Y. Xu, M.S. Slayter and S. Izumo, Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro, *Cell.* 75 (1993) 977-984.
- [106] N.R. Saunders, M.D. Habgood and K.M. Dziegielewska, Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26 (1999), 11-19.
- [107] P. Schelling, J.S. Hutchinson, U. Ganten, G. Sponer and D. Ganten, Impermeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier for angiotensin II in rats, *Clin. Science Mol. Medicine* 51 (1976) 399s-402s.
- [108] P. Schelling, D. Ganten, R. Heckl, K. Hayduk, J.S. Hutchinson, G. Sponer and U. Ganten, On the origin of angiotensin-like peptides in cerebrospinal fluid. In: J.P. Buckler and C.M. Ferrario (Eds.), *Central action of angiotensin and related hormones*, Pergamon Press, New York, 1977, pp. 519-526.
- [109] P. Schelling, U. Ganten, G. Sponer and T. Unger, Components of the renin-angiotensin system in the cerebrospinal fluid of rats and dogs with special consideration of the origin and fate of angiotensin II, *Neuroendocrinol.* 31 (1980) 297-308.
- [110] P. Schelling, S. Müller and E. Clauser, Regulation of angiotensinogen in cerebrospinal fluid and plasma of rats, *Am. J. Physiol.* 244 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.13) (1983) R466-R471.
- [111] C. Sernia, Location and secretion of brain angiotensinogen, *Regul Pept.* 57 (1995) 1-18.
- [112] M. Showkat Ali, P.P. Sayeski, L.B. Dirksen, D.J. Hayzer, M.B. Marrero and K. E. Bernstein, Dependence on the Motif YIPP for the Physical Association of Jak2 Kinase with the Intracellular Carboxyl Tail of the Angiotensin II AT1 receptor, *J Biol Chem.* 272 (37) (1997) 23382-23388.
- [113] C. Simon-Oppermann, D.A. Gray and E. Simon, Independent osmoregulatory control of central and systemic angiotensin II concentration in dogs, *Am J Physiol.* 250 (1986) R918-925.
- [114] R. Singh, A. Husain, C. Ferrario and R.C. Speth, Rat brain angiotensin II receptors: effects of intracerebroventricular angiotensin II infusion, *Brain Res.* 303 (1984) 133-139.
- [115] N.E. Sirett, S.N. Thornton and J.I. Hubbard, Brain angiotensin binding and central sarcosine 8 angiotensin responses in normal rats and the New Zealand strain of genetically hypertensive rats, *Clin Sci.* 56 (1979) 607-611.

- [116] R.M. Smith and L. Jarett, Ultrastructural evidence for the accumulation of insulin in nuclei of intact 3T3-L1 adipocytes by an insulin-receptor mediated process, *Proc Natl Acad Sci USA*. 84 (1987) 459-463.
- [117] R.M. Smith and L. Jarett, Partial characterization of insulin accumulation in H35 hepatoma cell nuclei. *Diabetes*. 39 (1990) 683-689.
- [118] K. Song, A.M. Allen, G. Paxinos and F.A.O. Mendelsohn, Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain, *J Comp Neurol*. 316 (1992) 467-484.
- [119] K. Song, J. Zhuo, A.M. Allen, G. Paxinos and F.A.O. Mendelsohn, Angiotensin II receptor subtypes in the rat brain and peripheral tissues, *Cardiology*. 79 (suppl 1) (1991) 45-54.
- [120] R.C. Speth and S.I. Harik, Angiotensin II receptor binding sites in brain microvessels, *Proc. Natl Acad Sci USA*. 82 (1985) 6340-6343.
- [121] J.F. Stamler, M.K. Raizada, R.E. Fellows and M.I. Philips, Increased specific binding of angiotensin II in the organum vasculosum of the lamina terminalis area of the spontaneously hypertensive rat brain, *Neurosci Lett*. 17 (1980) 173-178.
- [122] R. Stornetta, C.L. Hawelu-Johnson, P.G. Guyenet and K.R. Lynch, Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain, *Science*. 242 (1988) 1444-1446.
- [123] J. Tanaka, H. Kaba, H. Saito and K. Seto, Electro-physiological evidence that circulating angiotensin II sensitive neurons in the subfornical organ alter the activity of hypothalamic paraventricular neurohypophysial neurons in the rat. *Brain res*. 342 (1985) 361-365.
- [124] M. Tham, M.K. Sim and F.R. Tang, Location of renin-angiotensin system components in the hypoglossal nucleus of the rat, *Regul Pept*. 101 (2001) 51-57.
- [125] M.A. Thomas, G. Fleissner, S. Hauptfleisch and B. Lemmer, Subcellular identification of angiotensin I/II- and angiotensin II (AT₁)-receptor-immunoreactivity in the central nervous system of rats, *Brain Res*. 962 (2003) 92-104.
- [126] M.A. Thomas, G. Fleissner, S. Hauptfleisch and B. Lemmer, Localization of angiotensin II (AT₁)-receptor-immunoreactive fibres in the hypothalamus of rats: angiotensin II-sensitive tanycytes in the ependyma of the third ventricle?, *Brain Res*. 967 (2003) 281-284.
- [127] M.A. Thomas, G. Fleissner, M. Stöhr, S. Hauptfleisch and B. Lemmer, Localization of components of the renin-angiotensin-system in the suprachiasmatic nucleus of normotensive Sprague-Dawley rats: Part A: Angiotensin I/II, a light and electron microscopic study, *Brain Res*. Accepted.
- [128] M.A. Thomas, G. Fleissner, M. Stöhr, S. Hauptfleisch and B. Lemmer, Localization of components of the renin-angiotensin-system in the suprachiasmatic nucleus of normotensive Sprague-Dawley rats: Part B: Angiotensin II (AT₁)-receptors, a light and electron microscopic study, *Brain Res*. Accepted.
- [129] W.G. Thomas, Regulation of angiotensin II type 1 (AT₁) receptor function, *Regul Pept*. 79 (1999) 9-23.
- [130] W.G. Thomas and C. Sernia, Immunocytochemical localisation of angiotensinogen in the rat brain, *Neuroscience*. 25 (1988) 319-341.
- [131] K.A. Thompson, A.P. Soler, R.M. Smith and L. Jarett, Intranuclear localization of insulin in rat hepatoma cells: insulin/matrix association. *Eur J Cell Biol*. 50 (1989) 442-446.
- [132] P.B.M.W.M. Timmermans, P.C. Wong, A.T. Chiu, W.F. Herblin, P. Bensfield, D.J. Carini, R.J. Lee, R.R. Wexler, J.A.M. Saye and R.D. Smith, Angiotensin II Receptors and Angiotensin II Receptor Antagonists, *Pharmacol Rev*. 45 (1993) 2 205-251.
- [133] A.N. van den Pol, Neuronal imaging with colloidal gold, *J Microscopy*. 155 Pt 1 (1989) 27-59.
- [134] K. Witte, A. Schnecko, E.M. Buijs, J. van der Vliet, E. Scalbert, P. Delagrangé, B. Guardiola-Lemaître and B. Lemmer, Effects of SCN lesions on circadian blood pressure rhythm in normotensive and transgenic hypertensive rats, *Chronobiol Int*. 15 (3) (1998) 135-145.

- [135] W. Wittkowski, Tanocytes and Pituicytes: Morphological and Functional Aspects of Neuroglial Interaction, *Microscopy Res Tech.* 41 (1998) 29-42.
- [136] H. Yang, D. Lu and M.K. Raizada, Angiotensin II phosphorylation of the AT₁ receptor from rat brain neurons, *Hypertension.* 30 (1997) 351-357.
- [137] B.V. Zloković, D.J. Begley, M.B. Segal, H. Davson, Lj. Rakić, M.N. Lipovac, D.M. Mitrovic, and R.M. Jankov, Neuropeptide transport mechanisms in the central nervous system. In: Lj. Rakić, D.J. Begley, H. Davson, B.V. Zloković (Eds.), *Peptide and amino acid transport mechanisms in the central nervous system*, Stockton Press, New York, 1988, pp. 3-19.

TABELLE 2: Protokoll der Immunhistologie des AT₁-Rezeptorantikörpers (Paraffin)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
1	Perfusionsspülung	0,01 m PBS+Heparin	10 min	4°C
2	PFA-Perfusion	4% Paraformaldehyd	20 min	4°C
3	PFA-Nachfixierung	4% PFA	12 h	4°C
4	Waschen	0,01 m PBS (5x)	10, 20, 30 min, 1 h, 1h.	RT
5	Dehydrierung	70% Ethanol	1 h*	RT
		90% Ethanol	1 h	
		96% Ethanol	1h	
		100% Ethanol I.,II.,III	Je 1 h	
		Rotihistol I. + II.	Je 1 h	
6	Paraffineinbettung	Rotihistol/Paraplast 2:1	4 h	57 -58°C
		Rotihistol/Paraplast 1:1	12 h	
		Rotihistol/Paraplast 1:2	24 h	
		Paraplast I., II., III.	24 h	
		Paraplast IV.	Erstarren	4°C
7	Schneiden am Mikrotom	Coronal / 10 µm	--	RT
8	Entparaffinierung	Rotihistol I., II., III.	Je 10 min	RT
		100% Ethanol I. + II	Je 10 min	
		96% Ethanol	5 min	
		90% Ethanol	5 min	
		70% Ethanol	5 min	
9	Waschen	0,01 m PBS (2x)	Je 10 min	RT
10	Blockieren der endogenen Peroxidase	0,3%H ₂ O ₂ in 0,01 m PBS	15 min	RT
11	Waschen	0,01 m PBS (2x)	Je 10 min	RT
12	Waschen	0,01 m PBS + 0,25% Triton	10 min	RT
13	Präinkubation	3% n-gt-Serum in PBS (+0,25% Triton + 0,5% BSA)	1 h	RT
14	1.Antikörper-inkubation	rb-a-AT ₁ in PBS (1:150) + 1% n-gt-Serum (+0,25% Triton + 0,5% BSA)	36 h	4°C
15	Waschen	0,01 m PBS + 0,25% Triton (3x)	Je 10 min	RT
16	2.Antikörper-inkubation	gt-a-rb in PBS (1:200) + 1,5% n-gt-Serum (+0,25% Triton + 0,5% BSA)	30 min	RT

TABELLE 2 FORTSETZUNG: Protokoll der Immunhistologie des AT₁-Rezeptorantikörpers (Paraffin)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
17	Waschen	0,01 m PBS (3x)	Je 10 min	RT
18	Inkubation ABC-Serum [§]	Lösung A+B (1:50 in 0,01 m PBS)	45 min	RT
19	Waschen	0,01 m PBS (2x)	Je 10 min	RT
20	Waschen	0,05 m Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
21	DAB-Reaktion	0,025% DAB + 0,009% H ₂ O ₂ in 0,05 m Tris/HCl-Lösung	ca. 15 min	RT
22	Waschen	Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
23	Waschen	0,01 m PBS	10 min	RT
24	Waschen	Aqua Bidest	10 min	RT
25	Entwässerung	70% Ethanol	5 min	RT
		90% Ethanol	5 min	
		96% Ethanol	5 min	
		100% Ethanol I.+ II.	Je 10 min	
		Rotihistol I., II., III.	Je 10 min	
26	Eindeckeln	Entellan	--	RT

(*) Verweildauer im Medium kann um ein Vielfaches der angegebenen Zeit ausgedehnt werden.

(§) Lösung der Komponenten A + B ist mindestens eine ½ Stunde vor der Inkubation anzusetzen

TABELLE 3: Protokoll der Immunhistologie des Vasopressinantikörpers (Paraffin)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
1	Perfusionsspülung	0,01 m PBS+Heparin	10 min	4°C
2	PFA-Perfusion	4% Paraformaldehyd	20 min	4°C
3	PFA-Nachfixierung	4% PFA	12 h	4°C
4	Waschen	0,01 m PBS (5x)	10, 20, 30 min, 1 h, 1h.	RT
5	Dehydrierung	70% Ethanol	1 h*	RT
		90% Ethanol	1 h	
		96% Ethanol	1h	
		100% Ethanol I.,II.,III	Je 1 h	
		Rotihistol I. + II.	Je 1 h	
6	Paraffineinbettung	Rotihistol/Paraplast 2:1	4 h	57 -58°C
		Rotihistol/Paraplast 1:1	12 h	
		Rotihistol/Paraplast 1:2	24 h	
		Paraplast I., II., III.	24 h	
		Paraplast IV.	Erstarren	4°C
7	Schneiden am Mikrotom	Coronal / 10 µm	--	RT
8	Entparaffinierung	Rotihistol I., II., III.	Je 10 min	RT
		100% Ethanol I. + II	Je 10 min	
		96% Ethanol	5 min	
		90% Ethanol	5 min	
		70% Ethanol	5 min	
9	Waschen	0,01 m PBS (2x)	Je 10 min	RT
10	Blockieren der endogenen Peroxidase	0,3%H ₂ O ₂ in 0,01 m PBS	15 min	RT
11	Waschen	0,01 m PBS (2x)	Je 10 min	RT
12	Waschen	0,01 m PBS + 0,25% Triton	10 min	RT
13	Präinkubation	3% n-gt-Serum in PBS (+0,25% Triton + 0,5% BSA)	1 h	RT
14	1.Antikörper-inkubation	rb-a-Vaso in PBS (1:7500) + 1% n-gt-Serum (+0,25% Triton + 0,5% BSA)	36 h	4°C
15	Waschen	0,01 m PBS + 0,25% Triton (3x)	Je 10 min	RT
16	2.Antikörper-inkubation	gt-a-rb in PBS (1:200) + 1,5% n-gt-Serum (+0,25% Triton +0,5% BSA)	30 min	RT
17	Waschen	0,01 m PBS (3x)	Je 10 min	RT

TABELLE 3 FORTSETZUNG: Protokoll der Immunhistologie des Vasopressinantikörpers (Paraffin)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
18	Inkubation ABC-Serum [§]	Lösung A+B (1:50 in 0,01 m PBS)	45 min	RT
19	Waschen	0,01 m PBS (2x)	Je 10 min	RT
20	Waschen	0,05 m Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
21	DAB-Reaktion	0,025% DAB + 0,009% H ₂ O ₂ in 0,05 m Tris/HCl-Lösung	ca. 15 min	RT
22	Waschen	Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
23	Waschen	0,01 m PBS	10 min	RT
24	Waschen	Aqua Bidest	10 min	RT
25	Entwässerung	70% Ethanol	5 min	RT
		90% Ethanol	5 min	
		96% Ethanol	5 min	
		100% Ethanol I.+ II.	Je 10 min	
		Rotihistol I., II., III.	Je 10 min	
26	Eindeckeln	Entellan	--	RT

(*) Verweildauer im Medium kann um ein Vielfaches der angegebenen Zeit ausgedehnt werden.

(§) Lösung der Komponenten A + B ist mindestens eine ½ Stunde vor der Inkubation anzusetzen.

TABELLE 4: Protokoll der Immunhistologie des AT₁-Rezeptorantikörpers (Kunstharz / TEM)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
1	Perfusionsspülung	0,1 m PB + Heparin	10 min	4°C
2	PFA+GA+PiS-Perfusion	4% PFA + 0,05% GA + 0,2% PiS in 0,1 m PB	20 min	4°C
3	PFA+PiS-Nachfixierung	4% PFA + 0,2% PiS in 0,1 m PB	7 h	4°C
4	Waschen	0,01 m PB (5x)	10, 20, 30 min, 1 h, 1h.	RT
5	Schneiden am Vibratom	Coronal / 40 µm	--	RT
6	Inkubation in Saccharose	10% Saccharose in 0,1 m PB	20 min	RT
7	Schockgefrieren	In Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff	--	
8	Waschen	0,1 m PB (5x)	10 min	RT
9	Blockieren der endogenen Peroxidase	0,3% H ₂ O ₂ in 0,1 m PB	15 min	RT
10	Waschen	0,1 m PB (3x)	Je 10 min	RT
11	Präinkubation	3% n-gt-Serum in PB (+ 0,5% BSA)	1 h	RT
12	1. Antikörper-inkubation	rb-a-AT ₁ in PB (1:750) + 1% n-gt-Serum (+ 0,5% BSA)	36 h	4°C
13	Waschen	0,1 m PB (5x)	Je 10 min	RT
14	2. Antikörper-inkubation	gt-a-rb in PB (1:250) + 1,5% n-gt-Serum (+ 0,5% BSA)	2-3 h	RT
15	Waschen	0,1 m PB (5x)	Je 10 min	RT
16	Inkubation ABC-Serum [§]	Lösung A+B (1:50 in 0,01 m PBS)	90 min	RT
17	Waschen	0,1 m PB (3x)	Je 10 min	RT
18	Waschen	0,05 m Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
19	DAB-Reaktion	0,025% DAB + 0,009% H ₂ O ₂ in 0,05 m Tris/HCl-Lösung	ca. 15 min	RT
20	Waschen	Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
21	Waschen	0,1 m PB (2x)	Je 10 min	RT
22	Osmierung	4% Osmiumtetroxid in Aqua Bidest	30 min	RT
23	Waschen	0,1 m PB (2x)	Je 10 min*	RT
24	Dehydrierung	50% Ethanol	5 min	RT
		70% Ethanol	5 min	
		90% Ethanol	5 min	
		96% Ethanol	5 min	
		100% Ethanol I. + II.	Je 10 min	

TABELLE 4 FORTSETZUNG: Protokoll der Immunhistologie des AT₁-Rezeptorantikörpers (Kunstharz / TEM)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
25	Inkubation in Zwischenmedium	Propylenoxid (1,2-Epoxypropan) (2x)	Je 5 min	RT
26	Überführung in Kunstharz	Propylenoxid / Araldit 2:1	30 min	RT
		Propylenoxid / Araldit 1:1	30 min	
		Propylenoxid / Araldit 1:2	30 min*	
		Araldit	1 h	
27	Flacheinbettung in Kunstharz	Araldit	> 48 h	60°C

(*) Verweildauer im Medium kann um ein Vielfaches der angegebenen Zeit ausgedehnt werden.

(§) Lösung der Komponenten A + B ist mindestens eine ½ Stunde vor der Inkubation anzusetzen

TABELLE 5: Protokoll der Immunhistologie des Angiotensin I/II-Antikörpers (Kunstharz / TEM)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
1	Perfusionsspülung	0,1 m PB + Heparin	10 min	4°C
2	PFA+GA+PiS-Perfusion	4% PFA + 0,05% GA + 0,2% PiS in 0,1 m PB	20 min	4°C
3	PFA+PiS-Nachfixierung	4% PFA + 0,2% PiS in 0,1 m PB	7 h	4°C
4	Waschen	0,01 m PB (5x)	10, 20, 30 min, 1 h, 1h.	RT
5	Schneiden am Vibratom	Coronal / 40 µm	--	RT
6	Inkubation in Saccharose	10% Saccharose in 0,1 m PB	20 min	RT
7	Schockgefrieren	In Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff	--	
8	Waschen	0,1 m PB (5x)	10 min	RT
9	Blockieren der endogenen Peroxidase	0,3% H ₂ O ₂ in 0,1 m PB	15 min	RT
10	Waschen	0,1 m PB (3x)	Je 10 min	RT
11	Präinkubation	3% n-rb Serum in PB (+ 0,5% BSA)	1 h	RT
12	1. Antikörper-inkubation	gt-a-ANG I/II in PB (1:750) + 1% n-rb-Serum (+ 0,5% BSA)	36 h	4°C
13	Waschen	0,1 m PB (5x)	Je 10 min	RT
14	2. Antikörper-inkubation	rb-a-gt in PB (1:250) + 1,5% n-rb-Serum (+ 0,5% BSA)	2-3 h	RT
15	Waschen	0,1 m PB (5x)	Je 10 min	RT
16	Inkubation ABC-Serum [§]	Lösung A+B (1:50 in 0,01 m PBS)	90 min	RT
17	Waschen	0,1 m PB (3x)	Je 10 min	RT
18	Waschen	0,05 m Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
19	DAB-Reaktion	0,025% DAB + 0,009% H ₂ O ₂ in 0,05 m Tris/HCl-Lösung	ca. 15 min	RT
20	Waschen	Tris/HCl-Lösung	10 min	RT
21	Waschen	0,1 m PB (2x)	Je 10 min	RT
22	Osmierung	4% Osmiumtetroxid (OSO ₄) in Aqua Bidest	30 min	RT
23	Waschen	0,1 m PB (2x)	Je 10 min*	RT
24	Dehydrierung	50%, 70% Ethanol	Je 5 min	RT
		90% Ethanol	5 min	
		96% Ethanol	5 min	
		100% Ethanol I. + II.	Je 10 min	

TABELLE 5 FORTSETZUNG: Protokoll der Immunhistologie des Angiotensin I/II-Antikörpers (Kunstharz / TEM)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
25	Inkubation in Zwischenmedium	Propylenoxid (1,2-Epoxypropan) (2x)	Je 5 min	RT
26	Überführung in Kunstharz	Propylenoxid / Araldit 2:1	30 min	RT
		Propylenoxid / Araldit 1:1	30 min	
		Propylenoxid / Araldit 1:2	30 min*	
		Araldit	1 h	
27	Flacheinbettung in Kunstharz	Araldit	> 48 h	60°C

(*) Verweildauer im Medium kann um ein Vielfaches der angegebenen Zeit ausgedehnt werden.

(§) Lösung der Komponenten A + B ist mindestens eine ½ Stunde vor der Inkubation anzusetzen

TABELLE 6: Protokoll der Methylenblaufärbung (Paraffin)

#	Arbeitsschritt	Chemikalien/Konz.	Zeitdauer	Temperatur
1	Entparaffinierung	Rotihistol I., II., III.	Je 10 min	RT
		100% Ethanol I. + II	Je 10 min	
		96% Ethanol	5 min	
		90% Ethanol	5 min	
		70% Ethanol	5 min	
2	Waschen	Aqua Bidest (2x)	Je 10 min	RT
3	Methylenblaufärbung	1% Methylenblau in Aqua Bidest	2 h	RT
4	Waschen	Aqua Bidest (3x)	Je 10 min	RT
5	Fixieren der Färbung	5% Ammoniummolybdat	30 min	RT
6	Waschen	Aqua Bidest (2x)	Je 10 min	RT
7	Entwässerung	70% Ethanol	5 min	RT
		90% Ethanol	5 min	
		96% Ethanol	5 min	
		100% Ethanol I.+ II.	Je 10 min	
		Rotihistol I., II., III.	Je 10 min	
8	Eindeckeln	Entellan	--	RT

IX. Danksagung, Verzeichnis der eigenen Publikationen & Lebenslauf

DANKSAGUNG

„to absent friends“

Mein Dank gilt all jenen, die mich in den Jahren dieser Arbeit unterstützt haben und mir geholfen haben die Höhen und Tiefen dieser Promotion durch zustehen, ohne dabei den Blick für das Wesentliche zu verlieren.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Günther Fleissner und Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Björn Lemmer, die im Zuge einer Kooperation ihrer DFG-Projekte (Fl 77/17-2, 17-3 und Le 318/10-2,10-3) die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben und mich in ihre Arbeitsgruppen aufnahmen.

Ein spezielles Dankeschön geht an Edeltraud Thielen und Marion Stöhr, die mir jederzeit mit Rat zur Seite standen und mit mir die zahlreichen Hürden der Technik gekonnt übersprangen.

Mein herzlichster Dank gilt des Weiteren meiner ‚Doktormutter‘ Frau Dr. Gerta Fleissner, die mir in den langen Jahren neben neben meinem ‚Doktorvater‘ im Arbeitskreis ‚Neurobiologie Circadianer Rhythmen‘ zur Seite stand und mich auf meinem Weg in die Welt der Wissenschaft geduldig begleitete.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern aus tiefsten Herzen danken. Sie haben mir meinen wissenschaftlichen Weg ermöglicht und waren immer zur Stelle, wenn Not am Mann war.

Zu guter letzt möchte ich mich bei all meinen Freunden und Wegbegleitern bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank und meine tiefste Verbundenheit gilt hierbei Herrn Diplom Pysiker Klaus B. Rosenkranz und Frau Diplom Biologin Marion Stöhr.

EIGENE PUBLIKATIONEN

ORIGINALARBEITEN

Thomas M.A., Fleissner G., Hauptfleisch S., Lemmer B., Subcellular identification of angiotensin II and angiotensin II-immunoreactivity in the central nervous system of rats. *Brain Res.* 962:92-104, 2003.

Thomas M.A., Hauptfleisch S., Fleissner G., Lemmer B., Localization of angiotensin II (AT₁)-receptor-immunoreactive fibers in the hypothalamus of rats: angiotensin II-sensitive tanycytes in the ependyma of the third ventricle? *Brain Res.* 967:281-284, 2003.

Thomas M.A., Fleissner G., Stöhr M., Hauptfleisch S., Lemmer B., Localization of components of the renin-angiotensin-system in the suprachiasmatic nucleus of normotensive Sprague-Dawley rats: Part A: Angiotensin I/II, a light and electron microscopic study. *Brain Res.* in press 2004.

Thomas M.A., Fleissner G., Stöhr M., Hauptfleisch S., Lemmer B., Localization of components of the renin-angiotensin-system in the suprachiasmatic nucleus of normotensive Sprague-Dawley rats: Part B: Angiotensin II (AT₁)-receptors, a light and electron microscopic study. *Brain Res.* In press 2004.

TAGUNGSBEITRÄGE

Waterkamp M., Fleissner G., **Thomas M.** and Fleissner G., 1998: Fine-structural differences between the two types of extraretinal photoreceptors in the Tenebrionid beetle, *Zophobas atratus* (morio) (A) The stemmata. In: Elsner, N. and R. Wehner, Proc. Göttinger Neurobiologentagung: 392.

Fleissner G., Waterkamp M., **Thomas M.** and Fleissner G., 1998: Fine-structural differences between the two types of extraretinal photoreceptors in the Tenebrionid beetle, *Zophobas atratus* (morio) (B) The lamina and lobula-organs. In: Elsner, N. and R. Wehner, Proc. Göttinger Neurobiologentagung: 393.

Thomas M., Hauptfleisch S., Fleissner G., Lemmer B. Localisation of regulatory proteins and their reaction sites involved in the circadian control of blood pressure in normotensive and transgenic-hypertensive rats. 5. Kolloquium DFG-Schwerpunkt "Funktionelle und adaptive Mechanismen circadianer Systeme", München 28.-29.3., Abstr. P 91-92, 2000.

Thomas M., Hauptfleisch S., Fleissner G., Lemmer B. Localisation of angiotensin II and its reaction sites in the hypothalamus of normotensive and transgenic-hypertensive rats at two circadian times. 6. Kolloquium DFG-Schwerpunkt "Funktionelle und adaptive Mechanismen circadianer Systeme", München 26.-28.3., Abstr. No 39, 2001.

Thomas M., Hauptfleisch S., Fleissner G., Lemmer B. Localisation of the neuropeptide angiotensin II and its reaction sites involved in the circadian control of blood pressure in normotensive and transgenic-hypertensive rats at three circadian times. 7th Colloquium of the DFG Schwerpunktprogramm, Fraueninsel, 31.7. – 3.8., Abstr. p 60-61, 2002.

Arraj M., **Thomas, M.A.**, Zuther P., Lemmer B. Abolition of 24-h rhythm in heart rate but not in blood pressure of eNOS-knock-out in comparison to wild-type C57BL. *Naunyn-Schmiedenberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1), R42/168, 2004.

Thomas M.A., Gorbey S., Lemmer B. Localisation of renin-angiotensin-system components in the suprachiasmatic nucleus of normotensive sprague-dawley rats at the ultrastructural level by immunocytochemistry with DAB-staining. *Naunyn-Schmiedenberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1), R69/274, 2004.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Martin Alexander Thomas
Geburtsdatum, Ort: 14.08.1969, Frankfurt/Main

Schulische Ausbildung

1976 - 1980 Besuch der Grundschule (Beethovensschule, Offenbach/Main)
1980 - 1989 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Leibniz-Gymnasium der Stadt Offenbach/Main.

Berufliche Ausbildung

1990 - 1991 Studium der Mineralogie an der Technischen Hochschule Darmstadt ohne Abschluss.
1991 - 1999 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main. Abschluss: Diplom. Hauptfach: Zoologie; Nebenfächer: Anthropologie und Anatomie.
1999 - 2002 Doktorand am Zoologischen Institut der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main. Forschungsarbeit im Rahmen des DFG-Schwerpunkts: „Funktionelle & adaptive Mechanismen circadianer Systeme“, in den Abteilungen von Prof. Dr. G. Fleissner und Prof. Dr. med. Dr. h.c. B. Lemmer.
2003 - 2004 Fertigstellung des experimentellen Teils der Dissertationssarbeit „Lokalisation von Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems im Hypothalamus von normotensiven (Sprague-Dawley) und transgen-hypertensiven (TGR(mREN2)27) Ratten“.
April 2004 Abgabe der Dissertationsarbeit.

Berufliche- und außerberufliche Weiterbildung

1994 Pathologisches Praktikum an den Städtischen Kliniken Offenbach/Main
1996 Zoologisches Praktikum: „Verhalten der Säugetiere“ im Zoologischen Garten Nürnberg.
1998 Zoologisches Praktikum: „Tiergartenbiologie“ im Zoologischen Garten Nürnberg.
2000 „Kurs der Chronopharmakologie“ an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg.

Berufstätigkeit

1989 - 1990 Wehrdienst als VHF-Schreibfunker im 3.Fernmeldebattalion der 2.Panzer Grenadier-division
1994 - 1998 Einsatz als wissenschaftliche Hilfskraft in diversen Praktika am Zoologischen Institut der Johann Wolfgang Goethe Universität.
1999 Wissenschaftlicher Angestellter des Zoologischen Instituts der Johann Wolfgang Goethe Universität im Rahmen einer Forschungsförderung der Volkswagenstiftung „Identifizierung eines Magnetfeldrezeptors in Brieftauben“ (AZ: I / 74154).
Seit 2003 Tätigkeit als Gutachter für internationale naturwissenschaftliche Zeitschriften.
2003 Dozent im „Kurs der Chronopharmakologie“ an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg.
Seit 2003 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmakologie & Toxikologie der Klinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Aufbau und Leitung der Abteilung für Immunhistologie am Institut für Pharmakologie & Toxikologie